

JADER OLIVEIRA DA SILVA

**OCORRÊNCIA DE AFLATOXINA B₁ EM ARROZ CONSUMIDO POR MILITARES
DO EXÉRCITO BRASILEIRO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA
E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**



CURITIBA

2005

JADER OLIVEIRA DA SILVA

**OCORRÊNCIA DE AFLATOXINA B₁ EM ARROZ CONSUMIDO POR MILITARES
DO EXÉRCITO BRASILEIRO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA
E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias, do curso de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias, Universidade Federal do
Paraná

Orientador: Lys Mary B. Cândido

CURITIBA

2005



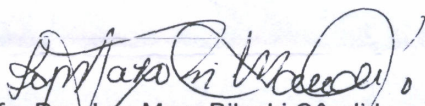
PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do Candidato ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Produção Animal, JADER OLIVEIRA DA SILVA após a realização desse evento, exarou o seguinte Parecer:

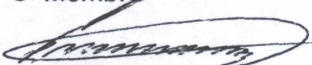
- 1) A Dissertação, intitulada **“OCORRÊNCIA DE AFLATOXINA B₁ EM ARROZ CONSUMIDO POR MILITARES DO EXÉRCITO BRASILEIRO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA”** foi considerada, por todos os Examinadores, como um louvável trabalho, encerrando resultados que representam importante progresso na área de sua pertinência.
- 2) O Candidato apresentou muito bem durante a Defesa da Dissertação, respondendo a todas as questões que foram colocadas.

Assim, a Comissão Examinadora, ante os méritos demonstrados pelo Candidato, e de acordo com o Art. 78 da Resolução nº 62/03 – CEPE considerou o candidato APROVADO concluindo que faz jus ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Produção Animal.

Curitiba, 31 de agosto de 2005.


Prof. Dra. Lys Mary Bileski Cândido
Presidente/Orientador


Prof. Dra. Elizabeth Santin
Membro


Dr. Cesar Antonio Lenz
Membro

DEDICATÓRIA

Dedico ao meu Pai, Manoel Oliveira Da Silva (in memorian) pelo exemplo deixado em vida, ao meu filho Eric e minha esposa Helenice.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Professora Dra Lys Mary B. Cândido, pela paciência e dedicação e sobretudo por acreditar na minha capacidade de concretização deste trabalho

Aos meus colegas Cap Vet Patrícia Luiza Wisniewski, Ten Flávia Fernanda Mazalli , Ten Cíntia Machado e Profa Daiana Novello pela ajuda e paciência nos momentos difíceis.

Ao Major de Cavalaria Gervásio, Capitão Veterinário Braga e Capitão Veterinário Fernanda Peixoto, da Seção de Remonta e Veterinária do Exército Brasileiro que com seu apoio permitiram as condições para a realização deste projeto.

Aos companheiros do 5º Batalhão de Suprimento pela compreensão e sobretudo paciência nos momentos de ausência.

A todos os meus amigos, que mesmo à distância sempre me apoiaram.

Ao Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), pela parceria oferecida para realização de parte deste projeto.

E a Deus, por mais esta oportunidade em minha vida, obrigado senhor.

MUITO OBRIGADO !

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 MICOTOXINAS.....	5
2.2 AFLATOXINAS	6
2.2.1 Natureza Química.....	7
2.3 METABOLISMO HEPÁTICO DA AFLATOXINA B ₁	9
2.4 MECANISMOS DE TOXICIDADE DA AFLATOXINA B ₁	11
2.5 CARCINOGENICIDADE DA AFLATOXINA B ₁	13
2.5.1 Estudos em Animais	13
2.5.2 Carcinogenicidade para a Espécie Humana.....	14
2.6 AFLATOXINAS EM ALIMENTOS	17
2.6.1 Ocorrência	17
2.6.2 Legislação	19
2.6.3 Métodos de Análise	21
2.6.3.1 Amostragem.....	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 MATERIAL.....	26
3.1.1 Amostras de arroz	26
3.1.2 Equipamentos e reagentes:.....	27
3.1.2.1 Cromatografia em camada delgada:.....	27
3.1.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência:	28
3.2 MÉTODOS	29
3.2.1 Umidade Relativa do Ar, Temperatura Ambiente e Umidade.	30
3.2.2 Cromatografia por Camada Delgada	31
3.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	33
3.2.3.1 Extração.....	34

3.2.3.2 Extração de fase sólida por cromatografia de afinidade	34
3.2.3.3 Fase móvel	35
3.2.3.4 Preparo de soluções para curva de calibração	36
3.2.3.5 Derivatização de aflatoxinas B ₁ e G ₁	37
3.2.3.6 Testes de recuperação e quantificação	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 TEOR DE UMIDADE DOS GRÃOS, UMIDADE RELATIVA DO AR E TEMPERATURA DE ARMAZENAGEM EM GRAUS CELSIUS	40
4.2 LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO E RECUPERAÇÃO EM CCD	46
4.3 OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS POR CCD	48
4.4 LINEARIDADE E CURVA DE CALIBRAÇÃO OBTIDAS PARA CLAE	49
4.5 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO E RECUPERAÇÃO POR CLAE	51
4.6 OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS POR CLAE	53
5 CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS	58
APÊNDICES	65
ANEXOS	84

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA QUÍMICA DAS AFLATOXINAS	8
FIGURA 2 - FLUXOGRAMA DE ABSORÇÃO, DISTRIBUIÇÃO E EXCREÇÃO DAS AFLATOXINAS	10
FIGURA 3 - METABOLISMO HEPÁTICO DA AFLATOXINA B ₁	12
FIGURA 4 - AMOSTRAGEM DE ARROZ PARA PESQUISA DE AFLATOXINA....	27
FIGURA 5 - DIAGRAMA DE FLUXO DE ANÁLISE DE AFLATOXINAS	30
FIGURA 6 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DE PLACA UNIDIMENSIONAL EM CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA	33
FIGURA 7 - PROCEDIMENTO GERAL	35
FIGURA 8 - DERIVATIZAÇÃO DE AFLATOXINA B ₁ E G ₁ UTILIZANDO KOBRACELL.....	38
FIGURA 9 - TEOR DE UMIDADE RELATIVA DO AR DURANTE OS MESES DE ESTOCAGEM DO ARROZ.....	42
FIGURA 10 - TEMPERATURA MÉDIA OBTIDA DURANTE OS MESES DE ESTOCAGEM DO ARROZ.....	42
FIGURA 11 - TEOR DE UMIDADE RELATIVA DO AR NA CIDADE DE CURITIBA- Pr.....	43
FIGURA 12 - TEMPERATURA MÉDIA NA CIDADE DE CURITIBA - PR.....	44
FIGURA 13 - GRÁFICO DE CURVA DE CALIBRAÇÃO	50
FIGURA 14 - CROMATOGRAMA DE AMOSTRA CONTAMINADA ARTIFICIAL- MENTE	52
FIGURA 15 - CROMATOGRAMA DE CONTAMINAÇÃO NATURAL EM ARROZ POR AFLATOXINA B ₁	54

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - RELAÇÃO ENTRE A INGESTÃO DE AFLATOXINA B ₁ (AFB ₁), EXCLUÍDAS OUTRA CAUSAS, E A INCIDÊNCIA DE CHC, EM PAÍSES DA ÁFRICA E ÁSIA.....	15
TABELA 2 - NÍVEIS MÁXIMOS PERMITIDOS PARA AFLATOXINAS EM ALIMENTOS PARA CONSUMO HUMANO (PPB).....	20
TABELA 3 - VALORES DE PESO MOLECULAR E ABSORTIVIDADE MOLAR DE AFLATOXINAS.....	36
TABELA 4 - PREPARO DE SOLUÇÕES PARA CURVA DE CALIBRAÇÃO.....	37
TABELA 5 - ALÍQUOTAS DE FASE MÓVEL, SOLUÇÃO DILUÍDA E CONCENTRAÇÃO OBTIDA PARA CLAE.....	37
TABELA 6 - TEOR DE UMIDADE DO ARROZ ANALISADO.....	41
TABELA 7 - TEOR DE UMIDADE RELATIVA DO AR	43
TABELA 8 - TEMPERATURA OBTIDA EM GRAUS CELSIUS.....	43
TABELA 9 - TEOR DE UMIDADE RELATIVA DO AR EM CURITIBA	43
TABELA 10 -TEMPERATURA OBTIDA EM GRAUS CELSIUS EM CURITIBA.....	44
TABELA 11 -LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO OBTIDO PARA AFLATOXINAS (µG/KG)	46
TABELA 12 -TAXA DE RECUPERAÇÃO DE AFLATOXINAS POR CCD.....	47
TABELA 13 -TAXA DE RECUPERAÇÃO DE AFLATOXINAS POR CROMATO- GRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	52
TABELA 14 -INCIDÊNCIA DE AFLATOXINAS EM ARROZ PELO MÉTODO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

AFB₁ - Aflatoxina B₁
AFM₁ - Aflatoxina M₁
AFP₁ - Aflatoxina P₁
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCD - Cromatografia em Camada Delgada
CHC - Carcinoma Hepatocelular
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DNA - Ácido Desoxiribonucleico
DAT - Dose Total
FAO - Food Agricultural Organization
HBV - Vírus da Hepatite B
HPLC - High Performance Liquid Chromatography
IAL - Instituto Adolfo Lutz
IARC - International Agency for Research on Cancer
Kg- Kilogramas
NaCl - Cloreto de Sódio
OMS - Organização Mundial da Saúde
PC - peso corpóreo
PPB - partes por bilhão
RNA -Ácido Ribonucleico
TFA - Ácido Trifluoroacético
UFC/g - Unidade Formadora de Colônia por grama
URA - Umidade Relativa do Ar
UV – ultra-violeta
µg - microgramas
WHO - World Health Organization

RESUMO

Alguns fungos são capazes de produzir metabólitos secundários denominados micotoxinas. Crescem rapidamente durante as fases de cultivo, colheita, secagem, transporte e estocagem de cereais sob condições favoráveis de temperatura, atividade de água e teor de umidade, pH, grau de contaminação, composição química dos alimentos, taxa de oxigenação, condições físicas dos grãos e presença de artrópodes. As aflatoxinas são metabólitos secundários produzidos por algumas cepas de fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente das espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*. Têm sido encontradas freqüentemente em amendoim, milho, feijão, rações. Também tem sido encontrada no arroz, um cereal que faz parte do hábito alimentar do brasileiro. A partir do conhecimento dos riscos à saúde decorrentes da presença de aflatoxinas em alimentos, foi realizado um levantamento para aflatoxina B₁ (AFB₁) em arroz beneficiado polido tipo I, destinado ao consumo pelos militares do Exército Brasileiro. As amostras foram coletadas no armazém do 5º Batalhão de Suprimento do Exército Brasileiro, Curitiba (Pr) no período de novembro de 2003 a fevereiro de 2004 e avaliada a ocorrência de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, utilizando-se as técnicas de cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Do total de 30 amostras analisadas por cromatografia em camada delgada, não foi verificada em nenhuma a presença de aflatoxinas com um limite de 3 µg/ Kg para este método. De 26 amostras analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência, 6 (23,07%) apresentaram positividade para aflatoxina B₁(AFB₁) com níveis entre 0,54 e 2,04 µg/kg e 1 (3,84%) apresentou presença de aflatoxina B₂ (AFB₂) com 1,84 µg/kg, com limite de quantificação de 0,5 µg/kg encontrado para este método. Este trabalho teve por objetivo contribuir não só com o controle de qualidade dos alimentos consumidos pelos militares da 5ª Região Militar do Exército Brasileiro no que se refere ao controle dos níveis de aflatoxinas, como comparar as técnicas de cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Palavras-chave: aflatoxinas, arroz, micotoxina, cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência.

ABSTRACT

Some fungi are able to develop secondary metabolites called mycotoxins. They grow quickly during breeding stage, harvest, drying, transport and stocking under ideal conditions of temperature, water activity and humidity, hydrogenionic potential, contamination degree, food chemical composition, oxygen rate, physical conditions of the grain and presence of arthropods. The aflatoxins are secondary metabolites produced by some strains of *Aspergillus* ssp, mainly *A.flavus* and *A.parasiticus* species. They have been found in peanut, maize, bean, feeds and rice, being the last one, one of the most popular items in Brazilian meals. Due to the danger for health resulted from the presence of aflatoxins in foods, had been achieved a mycotoxins lifting in benefited polished rice type 1, used by Brazilian army. The samples were collected at "5º Batalhão de Suprimento" (army department) from November 2003 to february 2004 when the incidence of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ was measured, by thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) methods. A total of 30 samples were tested performed by tlc, no aflatoxin detected. From a total of 26 samples, were performed by high performance liquid chromatography, 6 (23,07%) presented positive results for aflatoxin B₁ with 0,54 – 2,04 µg/kg and, 1 (3,84%) presented a positive result for aflatoxins B₂ with 1,84 µg/kg. This work compared the thin layer chromatography and high performance liquid chromatography techniques and contributes for the quality control of the foods to be consumed by militaries in the Brazilian army, concerning the control of the aflatoxins levels.

Keys word: aflatoxins, rice, mycotoxins, thin layer chromatography, high performance liquid chromatography

1 INTRODUÇÃO

Alguns fungos são capazes de produzir metabólitos secundários tóxicos e, algumas vezes cancerígenos tanto para o homem como para animais. Segundo FONSECA (2003), os fungos, bolores ou mofos podem diminuir o valor nutritivo das proteínas, por hidrólise das mesmas, no amendoim e na soja, além de prejudicar seriamente o aspecto externo dos alimentos. Esses fungos são chamados toxigênicos e os metabólitos são denominados micotoxinas (SABINO et al., 1982).

Segundo BOEING (1999), os fungos, para se desenvolverem e produzirem micotoxinas necessitam de condições favoráveis, sendo os fatores mais importantes a temperatura, atividade de água e teor de umidade, pH, composição química do alimento, taxa de oxigenação, período de armazenagem, grau de contaminação fúngica, condições físicas dos grãos ou sementes, artrópodes e interação microbiana. No que se refere à atividade de água, o mínimo para o desenvolvimento dos fungos toxigênicos é de 0,76 (MALLOZI; CORRÊA, 1998). Os fungos desenvolvem-se em produtos cuja atividade de água varia de 0,65 a 0,90 e teor de umidade dos grãos na faixa de 14 a 22 %. Por isto, na conservação de grãos é empregado o processo de secagem, o qual visa reduzir o teor de umidade dos produtos em níveis que a atividade de água não propicie a proliferação de fungos (SILVA, 2003).

O *Aspergillus* e o *Penicillium* são conhecidos como fungos de estocagem e, sob condições ideais, crescem rapidamente durante as fases de cultivo, colheita, secagem, transporte e estocagem. As micotoxinas são produzidas principalmente por fungos filamentosos de estruturas miceliais; são metabólitos secundários que não têm significado bioquímico no crescimento e desenvolvimento fúngico e, nem todos esses metabólitos secundários são tóxicos bem como, nem todos os fungos são tóxicos (OGIDO, 2003). Os fatores que contribuem para a presença ou produção de micotoxinas em alimentos e rações incluem estocagem, meio ambiente e as condições ecológicas. Muitas vezes, a maior parte destes fatores, está acima da capacidade de controle humano.

As aflatoxinas são metabólitos secundários, produzidos por algumas cepas de fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente das espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*, os quais se desenvolvem naturalmente em produtos alimentícios, e têm

sido freqüentemente encontrados em milho, amendoim, feijão, arroz e trigo, sementes de algodão, sorgo, especiarias, rações e frutas (CORRÊA, 2000).

Os fatores que afetam a magnitude da toxicidade em humanos ou animais que consomem alimentos ou rações contaminadas com micotoxinas, respectivamente, são a espécie, mecanismo e modo de ação e metabolismo.

Os mecanismos e a forma de ação mudam entre espécies e às vezes entre indivíduos. Um exemplo são as aflatoxinas que são conhecidas por se ligarem ao DNA e induzir efeitos mutagênicos e carcinogênicos em ratos; no entanto a diminuição da função das células T e a imunidade celular são formas de ação das aflatoxinas em bovinos, ovinos e suínos. (HUSSEIN e BRASEL, 2001).

Metabolismo e mecanismos de defesa são fatores de importante entendimento da toxicidade de micotoxinas por espécies ou individualmente. A especificidade de mecanismos semelhantes é bem demonstrada com significados diferentes entre ruminantes e não ruminantes no que se refere as micotoxinas. Estudos “in vitro” demonstram a habilidade da microbiota ruminal em degradar as micotoxinas. (HUSSEIN e BRASEL, 2001).

Em saúde animal, várias espécies domésticas e de experimentação são sensíveis aos seus efeitos tóxicos agudos, mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos, sendo o fígado o principal órgão atingido (OSWEILER, 1990).

São conhecidos, atualmente, 17 compostos similares designados pelo termo aflatoxina, porém, os principais tipos de interesse médico-sanitário são identificados como B₁, B₂, G₁ e G₂. Estes compostos caracterizam-se pela elevada toxicidade que apresentam (ROSA, 1995).

A aflatoxina B₁ (AFB₁) é a que apresenta maior poder toxigênico, seguida de G₁, B₂ e G₂ (COULOMBE, 1991).

De modo análogo, em saúde pública, as aflatoxinas têm sido identificadas como fatores envolvidos na etiologia do câncer hepático no homem, conseqüente à ingestão de alimentos contaminados.

Na última década, intensas pesquisas contribuíram para melhor caracterizar os possíveis efeitos das aflatoxinas sobre a saúde humana, com destaque para os experimentos sobre a atividade biológica da AFB₁ nas células hepáticas, no âmbito molecular, e sua aplicação em estudos populacionais.

Hoje, está bem reconhecido que as micotoxicoses (doenças causadas por micotoxinas) foram responsáveis por importantes epidemias em homens e animais, ao menos durante os tempos históricos recentes. As mais importantes foram o “ergotismo”, que matou dezenas de milhares de pessoas na Europa nos últimos 1000 anos; a aleucia tóxica alimentar (ATA), que foi responsável pela morte de milhares de pessoas na antiga União Soviética, na década de 30 e a aflatoxicose, que matou 100.000 perus jovens na Inglaterra em 1960 e tem causado morte e doenças em muitos outros animais e, provavelmente, também no homem (ANDRADE, 2004).

A conscientização dos produtores de alimentos e as ações de vigilância sanitária permanentes são essenciais para diminuir a exposição humana a esses compostos e prevenir doenças crônicas advindas dessa exposição (CALDAS, SILVA; OLIVEIRA, 2002).

Os cereais são facilmente colonizados por fungos patogênicos, proporcionados pelas condições favoráveis ao fungo no campo, depois da colheita e durante a estocagem (GALVANO et al., 2005).

O arroz é um cereal que faz parte do hábito alimentar do brasileiro, o que se confirma pelo alto consumo, considerando suas diferentes formas.

O fato de o arroz ser um alimento de consumo quase diário, pela maioria da população brasileira, torna importante o conhecimento dos níveis de contaminação fúngica e a identificação dos mesmos, para posterior avaliação das possíveis causas de contaminação, dos riscos à saúde do consumidor e possivelmente tomada de medidas efetivas no sentido de garantir a segurança alimentar da população (NUNES et al., 2003).

Segundo PEREIRA, CARVALHO e PRADO (2002), a presença de fungos no arroz e na manteiga de cacau afeta a qualidade, promovendo a descoloração, e no café produzem aromas desagradáveis.

Várias pesquisas sobre micotoxinas em arroz vêm sendo realizadas em diversos países, porém, no Brasil são poucas as ocorrências relatadas com níveis e incidências baixos.

A disponibilidade de um método sensível e confiável é um fator chave para o baixo nível detectado de aflatoxinas em arroz (LIPIGORNSON; ALI; YOSHIZAWA, 2003).

Dados anteriores sobre a contaminação com aflatoxinas na maioria dos países asiáticos, incluindo o arroz, são feitos por cromatografia em camada delgada (CCD), método com limite de detecção relativamente alto (LIPIGORNSON; ALLI; YOSHIZAWA, 2003).

Com vistas ao conhecimento de micotoxinas em alimentos, estudos visando aprimorar a metodologia para sua detecção e quantificação são sem dúvida necessários (SIMIONATO; ASTRAY; SYLOS, 2003).

O objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência e quantificar aflatoxinas em arroz beneficiado consumido por militares da 5ª Região Militar do Exército Brasileiro através de cromatografia em camada delgada (CCD) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MICOTOXINAS

Micotoxina é o termo usado para descrever substâncias tóxicas formadas durante o crescimento de fungos (mofo, bolor), o que está associado a mudanças na natureza física do alimento no sabor, odor e aparência (BOEING, 1999).

O termo micotoxinas deriva da palavra grega Mikes, que significa fungo, e da palavra latina toxicum, que significa veneno. Portanto, micotoxina é a toxina produzida por fungos (SCUSSEL, 1998).

As micotoxinas de grande significado em saúde pública e agricultura incluem as aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, zearalenona, fumonisinas e os alcalóides de ergots. Essas toxinas são responsáveis por prejuízos de milhões de dólares anuais em saúde humana, animal e produtos agrícolas (HUSSEIN e BRASEL, 2001). A Food and Agriculture Organization, estimou entre 5 e 10 % o total de alimentos perdidos no mundo anualmente por fungos e micotoxinas (DUXBURY, 2004).

Em 1993, a Agência Internacional para pesquisa do câncer da Organização Mundial da Saúde (WHO – IARC1993), avaliou o potencial cancerígeno das aflatoxinas, ocratoxinas, tricothecenes, zearalenona e fumonisinas. As aflatoxinas foram classificadas como cancerígenos para humanos (grupo 1), enquanto as ocratoxinas e fumonisinas foram classificadas como possíveis cancerígenos (grupo 2B). Tricotecenos e zearalenona, no entanto, não estão classificados como carcinógenos humanos.

Doenças em humanos e animais resultantes do consumo de micotoxinas são chamadas de micotoxicoses. Os efeitos em animais domésticos incluem: reação alérgica, baixo índice reprodutivo, perda de apetite, emagrecimento, imunossupressão, baixa conversão alimentar, desenvolvimento de tumores e mortalidade. Os órgãos mais afetados são o fígado, rins, cérebro, músculos e sistema nervoso.

Segundo CORRÊA (2000), os microfungos podem produzir três tipos gerais de manifestações clínicas no homem e animais:

- a) infecções ou doenças decorrentes da invasão de um tecido vivo;
- b) alergias ou reações de hipersensibilidade;
- c) toxicoses – intoxicações resultantes da ingestão de alimentos ou rações contendo metabólitos tóxicos.

O conhecimento sobre a contaminação por micotoxinas no Brasil ainda está direcionado para aflatoxinas e as culturas mais estudadas são o amendoim e o milho (SABINO, 1995).

Os fungos produtores de micotoxinas são saprófitos habituais do solo, ar e quando o meio ambiente é propício, colonizam diversos substratos (FREITAS e BADOLATO, 1992) e, dando-se condições necessárias para o crescimento fúngico e produção de micotoxinas, os produtos agrícolas podem ser contaminados no campo, após a colheita, no transporte e armazenamento (CORRÊA, 2000).

Segundo TANAKA (2001), vários fungos podem permanecer associados às sementes de milho durante o armazenamento, causando deterioração ou se mantendo viáveis. As toxinas já produzidas podem permanecer no alimento mesmo após a morte do fungo, e se apresenta em alimentos onde não são verificadas alterações visíveis (AMADO, 2003).

2.2 AFLATOXINAS

As aflatoxinas formam o grupo de toxinas fúngicas mais estudadas até hoje, sendo sua importância originária dos anos 60 quando uma grande mortalidade de perus na Inglaterra, denominada “doença X dos perus” foi relacionada com o farelo de amendoim importado do Brasil.

Os principais fungos aflatoxígenos são *Aspergillus flavus* e o *Aspergillus parasiticus* e, segundo BATISTA et al. (2002), eventualmente, *A. nomius*. As amostras isoladas de *A. flavus* geralmente produzem aflatoxinas B₁ e B₂ e as de *A. parasiticus*, com frequência são produtoras de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂. Eventualmente, alguns fungos isolados destas duas espécies podem produzir aflatoxina M₁ e B_{2a}.

Através de estudo de prevalência, a contaminação de grãos por fungos aflatoxigênicos por *A. flavus* é predominante sobre o *A. parasiticus* e sua produção é

favorecida por temperaturas entre 23-26°C e umidade relativa do ar acima de 75%, sendo que a umidade relativa do ar acima de 85% e temperatura em torno de 27° C favorece o crescimento e a produção de aflatoxinas por fungos toxigênicos (PRADO; MATOS; PEREIRA, 1989).

As aflatoxinas têm ponto de fusão alto, são estáveis ao calor sendo decompostas à temperatura de cerca de 220 °C (SCUSSEL, 1984).

2.2.1 Natureza Química

As aflatoxinas são bisfuranocumarinas derivadas de um decacetídeo, pela via biosintética dos policetídeos, no qual a unidade C₂ é perdida durante a formação dos anéis bisfuranos (SMITH; MOSS, 1985).

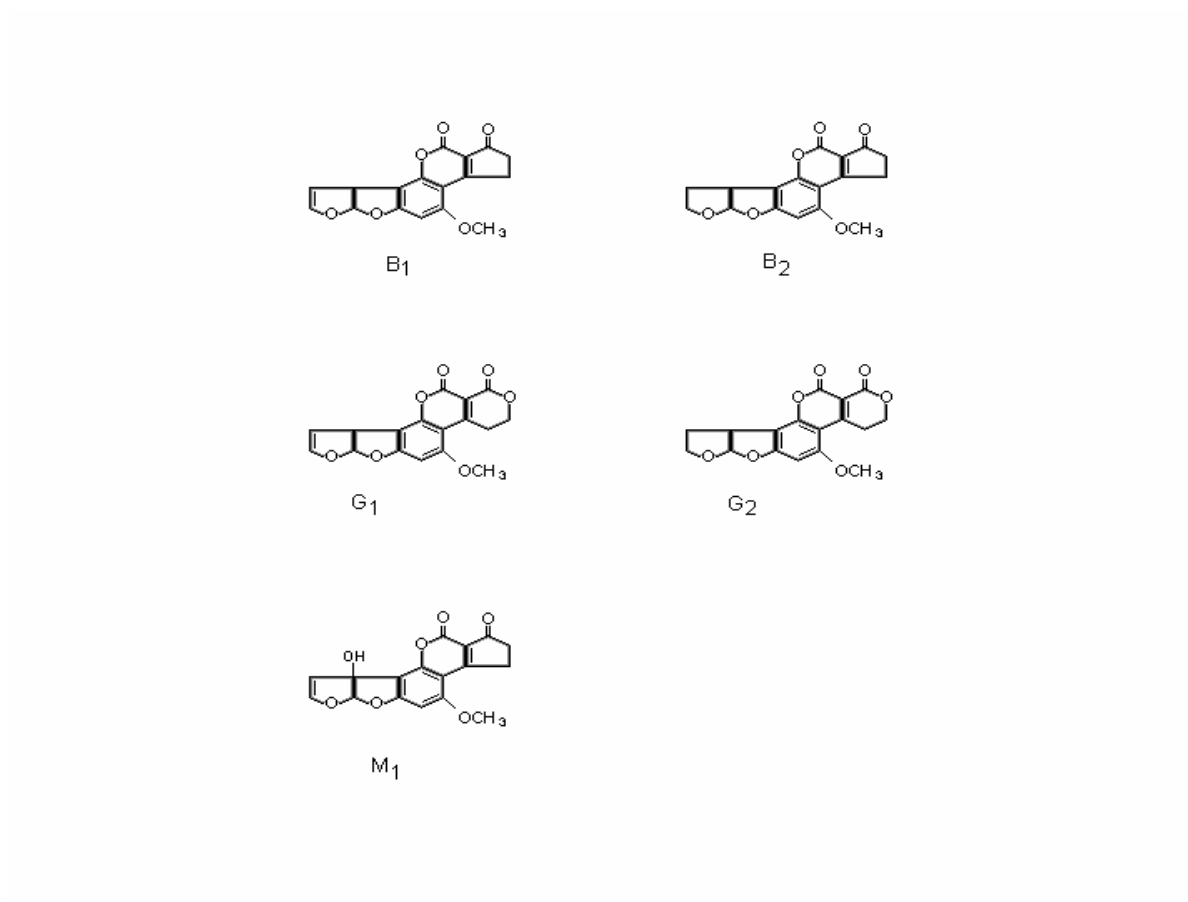
Estes compostos heterocíclicos são caracterizados como aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ e são distinguíveis cromatograficamente por suas fluorescências azuis (B de “Blue”) para aflatoxinas B₁ e B₂ e verdes (G de “Green”) para aflatoxinas G₁ e G₂ quando observados sob luz ultravioleta a 365 nm.

A série G das aflatoxinas difere quimicamente da série B pela presença de um anel 3-lactona, no lugar do anel ciclopentenona. Uma dupla ligação 8, 9 é encontrada na forma de um éter vinil no anel terminal furano nas aflatoxinas B₁ e G₁, mas não em B₂ e G₂. Essas variações que diferem as aflatoxinas estruturalmente estão associadas também a suas atividades, sendo as aflatoxinas B₁ e G₁ carcinogênicas e consideravelmente mais tóxicas que B₂ e G₂ (JAIMEZ et al., 2000).

A aflatoxina M₁ é um biotransformado da aflatoxina B₁, formada através do processo de hidroxilação, produzindo assim um derivado hidrossolúvel, o que possibilita a sua excreção por fluidos corporais. É considerado um potente hepatocarcinogênico e sua contaminação em leite para consumo humano tem recebido grande importância em saúde pública.

A figura 1 apresenta as estruturas químicas das aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, M₁.

FIGURA 1 - ESTRUTURA QUÍMICA DAS AFLATOXINAS



FONTE: FONSECA, 2003.

GONÇALVES et al. (1997), em estudos sobre carcinoma hepatocelular no Brasil, concluíram que investigações futuras serão necessárias para se estudar a presença de outros possíveis fatores etiológicos, como as aflatoxinas, tendo em vista as condições climáticas favoráveis à contaminação alimentar com fungos na maioria das regiões do Brasil.

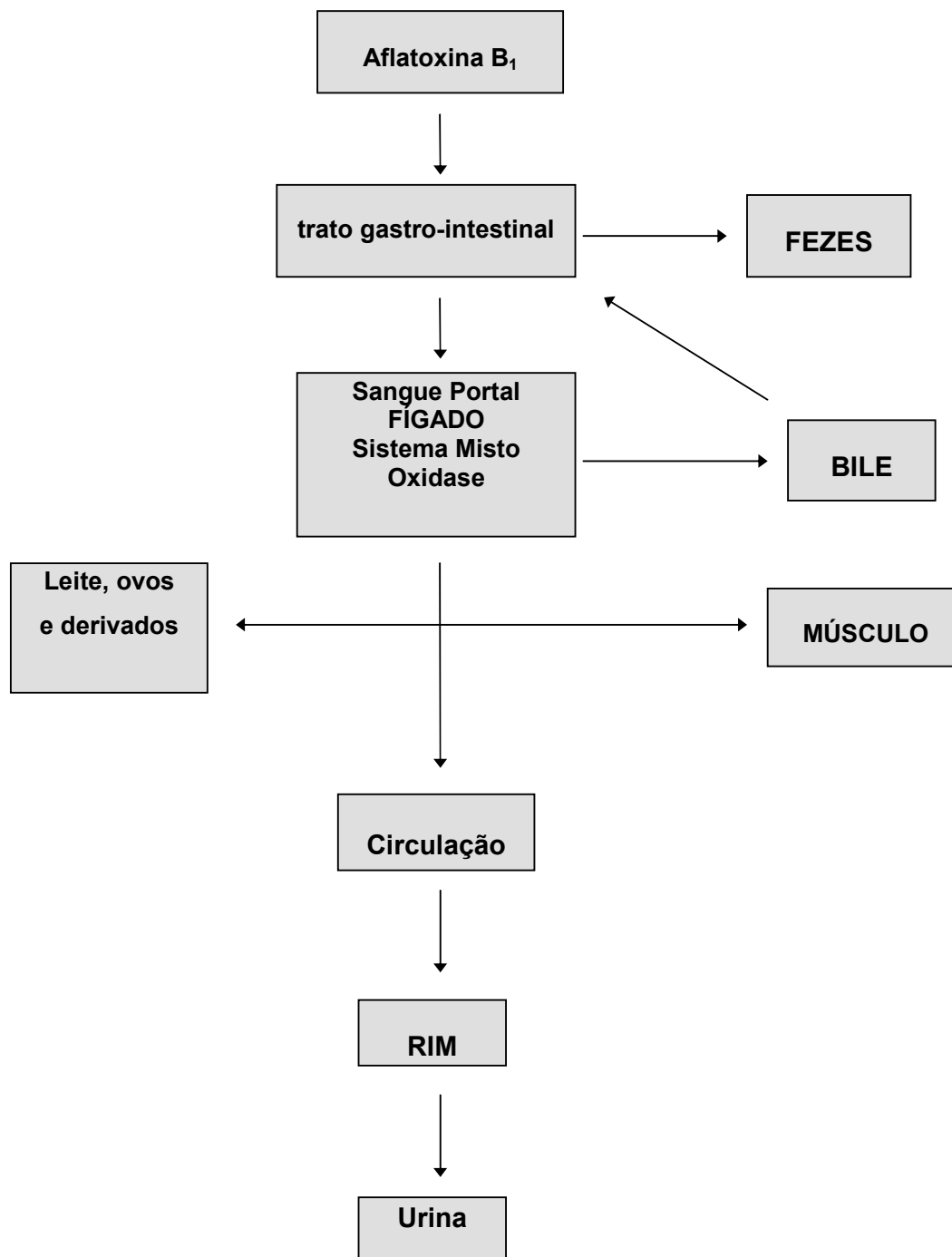
Mamíferos que ingerem produtos contaminados com aflatoxinas B₁ (AFB₁) excretam pequenas quantidades de aflatoxina M₁(AFM₁) no leite (PRADO et al., 2001).

2.3 METABOLISMO HEPÁTICO DA AFLATOXINA B₁

As aflatoxinas ingeridas, substâncias lipofílicas e de baixo peso molecular, são quase totalmente absorvidas por difusão passiva no intestino, passando para a corrente sanguínea (MELLO; NASCIMENTO e OLIVEIRA, 1999). A AFB₁ ingerida por mamíferos é absorvida e metabolizada a nível hepático conforme demonstra a figura 2. Os microssomos do sistema misto oxidase (MFO), são compostos por enzimas do citocromo p 450 e, segundo KLEIN et al. (2000) por 6 diferentes tipos de citocromos (citocromo P-450 1A2, 2A3, 2B7, 2K1 e 3A3/4). São hemoproteínas localizadas na membrana do retículo endoplasmático dos hepatócitos e constituem parte do processo de detoxicação de xenobióticos. Possuem a função de converter estas moléculas em compostos mais hidrossolúveis e conjugados com o ácido glicurônico, a carbonatos e sulfatos, exceto o aflatoxicol (ROSA, 1995). Entretanto, durante este mesmo processo, pelo sistema enzimático, ocorre o que se chama “ativação metabólica”, onde compostos altamente reativos e nucleofílicos, com atividade tóxica semelhante à precursora AFB₁ são formados. Segundo HUSSEIN e BRASEL (2001), a forma pura da AFB₁ não é mutagênica e é biotransformada, sendo quatro os metabólitos formados: AFP₁; AFB₁ epóxido (tóxico, mutagênico e carcinogênico); aflatoxicol e AFM₁ (tóxica).

A AFB₁ – epóxido ao se ligar com o DNA, modifica sua estrutura e sua atividade biológica desencadeando os efeitos mutagênicos e carcinogênicos da AFB₁. A formação de adutos ocorre através da ligação com guaninas da molécula de DNA, na posição N₇, ao nível do códon 249 do gene supressor de tumores p 53 (OGIDO, 2003). Esta ocorrência é característica de vários carcinomas, sobretudo hepáticos.

FIGURA 2 - FLUXOGRAMA DE ABSORÇÃO, DISTRIBUIÇÃO E EXCREÇÃO DAS AFLATOXINAS



FONTE: ADAPTADO DE ROSA, 1995.

A aflatoxina M₁ tem sido detectada em leite de vacas, ovelhas e cabras que consumiram alimentos contaminados com Aflatoxinas B₁ (SMITH e MOSS, 1985). A ingestão da aflatoxina diminui a produção de leite, a produção e eclodibilidade dos ovos, passa para o leite (1 a 3% da toxina ingerida) e, por conseguinte, passa para o queijo, iogurte etc (ANDRADE, 2004).

Dentre os possíveis alimentos nos quais a aflatoxina pode ser detectada, o leite humano merece destaque. Pode veicular aflatoxina M₁, decorrente do metabolismo do organismo materno, o que pode acarretar problemas à saúde do lactente (PÁDUA, SILVEIRA, MARTINS, 2002).

A aflatoxina M₁ pode ser detectada no leite e na urina de vacas alimentadas com ração contendo aflatoxinas em até 48 horas após a ingestão de AFB₁, não sendo mais detectada a partir do quarto dia. Desse modo, o animal que consome poderá eliminar, imediatamente, através do leite, a aflatoxina M₁, "milk toxin", que é bastante perigosa para animais jovens aos quais o leite é destinado, e também aos humanos, que apresentam grande sensibilidade as aflatoxinas (PÁDUA, SILVEIRA, MARTINS, 2002).

2.4 MECANISMOS DE TOXICIDADE DA AFLATOXINA B₁

A aflatoxina B₁ (AFB₁), principal metabólico produzido por fungos do gênero *Aspergillus*, manifesta seus efeitos tóxicos após conversão hepática em AFB₁ epóxido, o qual reage com macromoléculas celulares, incluindo proteínas, RNA (ácido ribonucléico) e DNA (ácido desoxirribonucléico). A reação com o DNA ocorre através da ligação com guaninas, ao nível do códon 249, do gene supressor de tumores p53, como citado anteriormente.

Em seres humanos, estudos de biomonitoramento individual de derivados AFB₁ N₇ guanina tem demonstrado que as aflatoxinas constituem importantes fatores de risco, com uma provável interação sinérgica com o vírus da hepatite B, para o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular em populações expostas (OLIVEIRA e GERMANO, 1997).

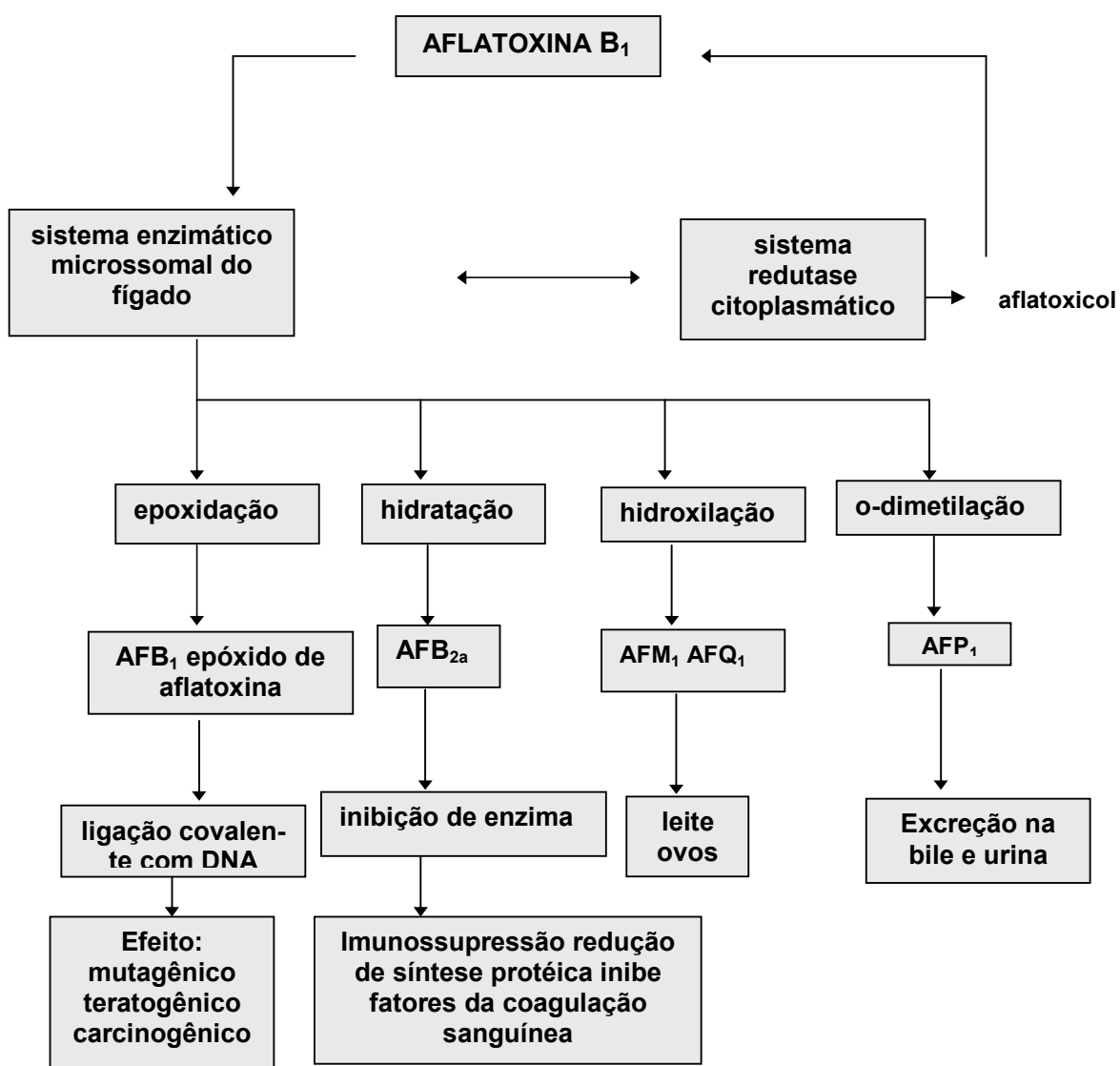
A absorção das aflatoxinas ocorre no trato gastro-intestinal e sua biotransformação ocorrem primariamente no fígado (OGIDO, 2003). A

biotransformação da AFB₁, particularmente, tem sido estudada com maior interesse, uma vez que guarda estreita relação com seus mecanismos de ação tóxica.

Existe atualmente consenso entre grande número de especialistas, de que a AFB₁ é, na verdade, um pró-carcinogênico, o qual requer ativação metabólica para manifestar seus efeitos tóxicos (OGIDO, 2003; OLIVEIRA e GERMANO, 1997).

A figura 3 apresenta um esquema de metabolismo hepático das aflatoxina B₁. A aflatoxina B₁ através do sistema microsomal hepático sofre “ativação metabólica” formando metabólitos com atividades tóxicas ao organismo humano e animal.

FIGURA 3 - METABOLISMO HEPÁTICO DA AFLATOXINA B₁



FONTE: ADAPTADO DE ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 1983

2.5 CARCINOGENICIDADE DA AFLATOXINA B₁

2.5.1 Estudos em Animais

A carcinogênese hepática representa o mais importante efeito de toxicidade crônica das aflatoxinas. Esta capacidade tem sido demonstrada extensivamente, sobretudo em relação à AFB₁, em muitas espécies animais, incluindo peixes, aves, roedores, carnívoros e primatas (OLIVEIRA e GERMANO, 1997). Nestes animais, a AFB₁ induz à formação de carcinoma hepatocelular (CHC), mesmo quando ingerida em quantidades muito baixas, o que permite considerá-la como um dos mais potentes hepatocarcinógenos naturais. Embora o fígado seja o alvo primário, o desenvolvimento de tumores em outros órgãos, como pâncreas e intestino tem sido observado em animais alimentados com rações contendo aflatoxinas (OLIVEIRA e GERMANO, 1997).

Existem inúmeros estudos sobre a carcinogenicidade da AFB₁ em diferentes espécies animais, sendo que diversas revisões encontram-se publicadas (OLIVEIRA e GERMANO, 1997). A dose efetiva de AFB₁ ingerida para a indução de tumores hepáticos varia amplamente entre as espécies, de modo similar ao que ocorre em relação à toxicidade aguda. MELLO, NASCIMENTO e OLIVEIRA (1999) relataram um surto de intoxicação por aflatoxina B₁ presente em polpa cítrica peletizada (5 ppm) em 150 bovinos confinados, com quadro de diarreia sanguinolenta, desidratação e epistaxe, finalizando com 18 mortes.

Peixes e aves são extremamente sensíveis, e a dose efetiva para a indução de hepatomas situa-se entre 10 - 30 µg/kg de AFB₁ na dieta, e os suínos estão entre as espécies mais sensíveis às micotoxinas (HUSSEIN e BRASEL, 2001). Contudo, a sensibilidade é particularmente variável entre os roedores, sendo que os ratos respondem a níveis de 15 - 1.000 µg/kg de AFB₁ na dieta, enquanto que certas linhagens de camundongos não apresentam nenhuma resposta em doses de até 150.000 µg/kg. Para a maioria das espécies estudadas, a sensibilidade é acentuadamente maior nos machos do que nas fêmeas (OLIVEIRA e GERMANO, 1997).

A comparação quantitativa da potência carcinogênica da AFB₁ entre as espécies animais pode ser facilitada pelo cálculo estatístico da dose média para a produção de tumores (DT₅₀), expressa em µg/kg peso corpóreo /dia.

2.5.2 Carcinogenicidade para a Espécie Humana

O carcinoma hepatocelular (CHC) é uma das neoplasias malignas mais comuns em todo o mundo (CARREIRO, 2004), apresentando, porém, uma acentuada variação geográfica no que concerne à incidência, com predomínio em alguns países da África, Ásia e ilhas do Pacífico. A incidência do CHC é maior nos homens do que nas mulheres, predominantemente na faixa etária de 30 - 50 anos. Entre os países com maior incidência, destacam-se Moçambique, Zimbábue, Etiópia, China (costa sudoeste) e Taiwan. Os países com incidência intermediária são Swazilândia, Japão e os da parte central e sudoeste da Europa (OLIVEIRA e GERMANO, 1997).

Aproximadamente 250.000 mortes são causadas por CHC anualmente na China e na África sub-saariana e são atribuídas aos fatores de risco entre os quais as aflatoxinas e o vírus da hepatite B (HUSSEIN e BRASEL, 2001). As diferenças extremas observadas na incidência do CHC entre os diversos países sugerem o envolvimento de fatores ambientais em sua etiologia. Dentre os fatores identificados, os que apresentam maior importância são as aflatoxinas e o vírus da hepatite B (HBV) (HARRIS, 1991).

Diversos autores têm reportado a presença de aflatoxinas no soro e em biópsias de fígado de pacientes com câncer hepático (OLIVEIRA e GERMANO, 1997).

HAAS (2000) pesquisou a presença de marcadores biológicos para aflatoxina B₁, em residentes da cidade de São Paulo e realizou levantamento da ocorrência de carcinoma hepatocelular em pacientes de hospitais de São Paulo e Santa Catarina. Todas as amostras avaliadas apresentaram níveis do aduto AFB₁-Lys (aduto de AFB₁-Lys por mg de albumina sérica) oscilando de 3 a 57 pg/mg, com teor médio de 14,9 pg/mg. Estudos experimentais demonstram que a formação de adutos AFB₁ – DNA é diretamente proporcional à dose de AFB₁ ingerida, e a indução

de tumores hepáticos em animais expostos (CHOY¹, citado por OLIVEIRA e GERMANO, 1997, p. 422)

Entretanto, a hipótese de que a ingestão de aflatoxinas constitui fator de risco para o CHC no homem é melhor amparada por evidências experimentais e epidemiológicas (OLIVEIRA e GERMANO, 1997). As experimentais derivam da extrapolação para o homem, dos resultados obtidos em estudos de biotransformação, mutagenicidade e carcinogenicidade em animais e em preparações in vitro.

A Tabela 1 apresenta os resultados de alguns trabalhos, onde se demonstra a associação estatística entre a incidência de câncer hepático e o grau de exposição as aflatoxinas.

TABELA 1 - RELAÇÃO ENTRE A INGESTÃO DE AFLATOXINA B₁ (AFB₁), EXCLUÍDAS OUTRA CAUSAS, E A INCIDÊNCIA DE CHC, EM PAÍSES DA ÁFRICA E ÁSIA

País	Ingestão de AFB ₁ (µg/ kg pc / dia)	Incidência de CHC (100000/ano)
Kênia	3,5	1,2
	5,9	2,5
	10,0	4,0
Moçambique	20,3	5,9
	38,6	5,0
	77,7	12,1
	86,9	9,0
	87,7	15,5
	131,4	17,7
	183,7	14,0
China	21,0	175,4
	157,0	182,2
	1232,0	288,5
	3545,0	613,5

CHC: carcinoma hepatocelular
µg/kg de peso corpóreo por dia

FONTE: OLIVEIRA e GERMANO, 1997.

Em 1987 a “Agência Internacional para Pesquisa do Câncer” (IARC) da Organização Mundial da Saúde (OMS), concluiu que existiam evidências suficientes

¹ CHOY, W. N. A review of the dose – response induction of DNA adducts by aflatoxins B₁, and its implications to quantitative cancer-risks assessment. **Mutation Research**, v. 296, p.181-98, 1993.

para considerar a AFB₁ como fator etiológico do câncer hepático em populações humanas (OLIVEIRA e GERMANO, 1997).

Segundo OLIVEIRA e GERMANO (1997), apesar da consistência dos dados apresentados na tabela 2, não existe, até o presente, uma caracterização completa da relação dose-resposta para as aflatoxinas no homem. Isto se deve, entre outras causas, ao fato de que, nos estudos epidemiológicos, o grau de exposição não é preciso, uma vez que foi estimado a partir dos níveis de contaminação por AFB₁ na dieta das populações, e não na dose efetivamente ingerida individualmente, tal como ocorre em animais submetidos à experimentação.

A comprovação científica do envolvimento das aflatoxinas na etiologia do câncer hepático, no homem, é dificultada pelo fato de que, em sua grande maioria, os estudos epidemiológicos foram realizados em áreas onde a infecção pelo HBV é endêmica e, também, correlacionada à incidência do CHC (STOLOFF, 1987).

O HBV é considerado o principal fator de risco para o câncer hepático em certas populações, como a de Taiwan. Nesse país, estudos prospectivos demonstraram que existe uma alta incidência do CHC em portadores de HBV (OLIVEIRA e GERMANO, 1997).

Existem evidências de que outras doenças, como a síndrome de Reye e o kwashiorkor, também estejam associadas às aflatoxinas. O kwashiorkor é uma afecção que mata milhões de crianças nos países subdesenvolvidos, e pode ser causado por uma inadequação proteico-calórico da dieta. Todavia, pesquisadores têm apresentado a hipótese de que o kwashiorkor pode resultar da intoxicação aguda por aflatoxinas (SCUSSEL, 1998).

KOBACAS et al. (2003) pesquisaram os efeitos da aflatoxina B₁ no desenvolvimento do kwashiorkor em camundongos e concluíram que deve haver contribuição da aflatoxina B₁ no desenvolvimento do kwashiorkor.

Apesar da intensa discussão sobre este assunto, a tendência atual entre os pesquisadores, de modo geral, é considerar a etiologia do câncer hepático como multifatorial, com uma provável interação sinérgica entre as aflatoxinas, atuando como iniciadoras do processo cancerígeno, e o HBV, o qual teria um efeito promotor sobre o desenvolvimento do tumor (OLIVEIRA e GERMANO, 1997).

2.6 AFLATOXINAS EM ALIMENTOS

2.6.1 Ocorrência

A exposição humana a micotoxinas pelo consumo de alimento contaminado é questão de saúde pública no mundo todo. Programas de monitoramento dos níveis de contaminação de alimentos por micotoxinas são essenciais para estabelecer prioridades em ações de vigilância sanitária. No Brasil, as aflatoxinas são as únicas micotoxinas cujos níveis máximos em alimentos estão previstos na legislação. Este limite é comparável aos estabelecidos por outros países e recomendado pela Organização Mundial da Saúde e pela Organização para Alimentação e Agricultura (WHO/FAO, 1998).

Níveis elevados de contaminação têm sido encontrados em amendoim e derivados. Por ultrapassarem os níveis máximos permitidos pela legislação brasileira, podem significar fator de risco para a população que os consome regularmente.

A alta incidência de aflatoxinas em amendoim encontrada no Brasil se deve principalmente às tradicionais práticas de colheita, secagem e armazenamento utilizado pelos produtores. SABINO et al. (1995), mostraram que a contaminação por aflatoxinas em amendoim continua um problema sério no Brasil e que se deve levar em conta além das condições climáticas (umidade e altas temperaturas), as práticas de agricultura e as condições de estocagem.

Condições de alta umidade e temperatura aumentam a probabilidade de desenvolvimento do *Aspergillus* e de produção de aflatoxinas, situação agravada no período chuvoso. A biodeterioração de sementes e grãos, no campo e durante o armazenamento, limita o acondicionamento seguro e o valor nutricional desses alimentos.

Os fungos e insetos são provavelmente os mais importantes organismos que provocam deterioração. Eles podem afetar cor, odor, sabor, valor nutricional, bem como produzir micotoxinas, como as aflatoxinas.

O amendoim é um produto agrícola importante para a agricultura brasileira, porém, é muito suscetível à contaminação por bolores, inclusive os toxigênicos. Atualmente o valor do amendoim é depreciado pela presença das aflatoxinas, em

virtude dos danos que podem causar à saúde. Segundo MORAES et al. (2003), o cultivo desse produto ficou praticamente com os pequenos produtores, persistindo o sistema rudimentar de plantio e colheita sendo, o Brasil freqüentemente notificado pelos países da União Européia sobre problemas de contaminação acima dos limites estabelecidos pela regulamentação nº 1525 (EUROPEAN..., 1998). Por isso, métodos de descontaminação estão sendo cada vez mais estudados a fim de diminuir os níveis da toxina em lotes contaminados.

ZOVICO et al. (1999) realizaram, em amendoim, a separação dos grãos contaminados dos grãos sadios através de equipamentos de seleção eletrônica pela cor, seguida ou não por seleção manual para avaliar a eficiência da seleção eletrônica nas condições em que as cerealistas preparadoras brasileiras trabalham normalmente. Avaliaram se ocorre uma efetiva descontaminação de lotes comerciais de amendoim "in natura" contaminados com aflatoxinas e concluíram que o processo de seleção estudado não diminuiu substancialmente os níveis iniciais médios de aflatoxinas em lotes menos contaminados.

PRADO et al. (1999) verificaram resistência de quatro genótipos de amendoim à produção de aflatoxina B₁ por *Aspergillus flavus* e concluíram que é necessário conhecer melhor as variações como as observadas nos genótipos VRR-245 e 2117, em função da cepa de *Aspergillus* utilizada, do seu potencial toxigênico, do processo de inoculação em si e das condições de cultivo e colheita.

BATISTA et al. (2002) pesquisaram formas termolisadas e vivas de leveduras na redução de toxicidade causada por aflatoxinas e concluíram que as leveduras termolisadas foram incapazes de suprimir os efeitos das aflatoxinas e que, as leveduras vivas foram capazes de reduzir os efeitos promovidos por aflatoxinas.

COSTA e SCUSSEL (2002) pesquisaram fungos toxigênicos em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), classes preto e cores, cultivados em diferentes regiões do Estado de Santa Catarina. A média total de fungos filamentosos foi de $2,8 \times 10^3$ e $6,7 \times 10^3$ UFC/g para feijão classe preto e cores, respectivamente *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. e *Phoma* spp. foram os gêneros mais freqüentes isolados. No feijão classe preto, 24,6% das cepas de *Aspergillus* isoladas eram toxigênicas: 13,1% eram produtoras de aflatoxinas e, 22,1% de cepas de *Aspergillus* isolados do feijão classe cores, produziram micotoxinas (16,7% produziram AF e 5,4% produziram ocratoxina).

TANAKA (2001), analisando a microflora fúngica de sementes de milho em ambientes de armazenamento, observou que *Aspergillus* e *Penicillium* tiveram suas incidências aumentadas ao longo do período, principalmente em ambiente não controlado.

GLÓRIA et al. (2004) analisaram a distribuição da contaminação com aflatoxinas em amostras de milho entre quatro frações. As frações que continham grãos ardidos, mofados, queimados e brotados continham níveis mais altos de aflatoxinas.

PIEIDADE et al. (2002) pesquisaram a distribuição em frações de milho segregadas visualmente por defeitos e concluíram que a fração de grãos não sadios contribuiu com 84% da contaminação estimada das amostras e que a separação dos grãos não sadios poderá favorecer uma redução na contaminação dos lotes de milho.

O consumo de rações contendo farelo de amendoim, milho ou qualquer outro alimento contaminado com a aflatoxina pode causar a morte de animais ou diminuir seu desempenho, desenvolvimento e produção de maneira que só será percebida quando o prejuízo já ocorreu, além de provocar câncer no fígado de várias espécies (ANDRADE, 2004).

LIPIGORNGOSON, ALI e YOSHIZAWA (2003) analisaram AFB₁, B₂, G₁ e G₂ em amostras de arroz da Tailândia, Paquistão e Bangladesh utilizando os métodos ELISA e colunas de imunoafinidade com cromatografia líquida de alta eficiência e, encontraram AFB₁ em 25% das amostras analisadas por cromatografia líquida.

2.6.2 Legislação

Desde a descoberta das aflatoxinas, em 1960, diversos países adotaram limites de tolerância para essas toxinas em produtos destinados ao consumo humano. O Brasil, com base nos conhecimentos então disponíveis, estabeleceu, em 1977, o limite de 30 µg/kg para a soma das frações B₁ e G₁ em qualquer tipo de alimento, porém, a Portaria nº 183 de 1996 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento estabelece um limite de 20 µg/kg para Aflatoxinas B₁ + B₂ + G₁ + G₂ e, um limite máximo de 50µg/kg para ração animal. (BRASIL, 1977, 1996).

Desconhece-se, contudo, se estes valores ainda representam ou não risco significativo para o desenvolvimento do câncer hepático.

Pelas sérias implicações para a saúde humana e animal que a presença de micotoxinas em grãos e outros gêneros alimentícios possuem, muitos países já elaboraram leis estipulando as quantidades máximas de micotoxinas permissíveis em alimentos e rações. A tabela 2 apresenta os limites máximos para aflatoxinas permitidos em alimentos para consumo humano em vários países.

TABELA 2 - NÍVEIS MÁXIMOS PERMITIDOS PARA AFLATOXINAS EM ALIMENTOS PARA CONSUMO HUMANO (PPB)

PAÍS	NÍVEL MÁXIMO	ALIMENTO
União Européia	2 (B ₁); 4 (total)	Cereais e produtos processados
Austrália	5 (total)	Todos alimentos
Brasil	20 (total)	Amendoim e derivados de milho
Índia	30 (total)	Todos alimentos
Japão	10 (total)	Todos alimentos
Singapura	0	Todos alimentos
África do Sul	5 (B ₁)	Todos alimentos
	10 (total)	
Suécia	5 (Total)	Todos alimentos
Estados Unidos	20 (total)	Todos alimentos
Alemanha	2 (B ₁)	Todos alimentos
	4 (Total)	
	0,05 (Total)	Alimentos infantis

FONTE: FONSECA (2004)

A maioria dos países desenvolvidos não autoriza importações de produtos com quantidades acima dos limites especificados. Por isso, as micotoxinas têm também implicações para o comércio internacional.

No Brasil, as aflatoxinas são as únicas micotoxinas cujos níveis máximos em alimentos estão previstos na legislação.

O Ministério da Saúde, através da Resolução RDC n. 274, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), de 15 de outubro de 2002, estabelece o limite de 20µg/kg para aflatoxinas totais em amendoim, pasta de amendoim e milho, e 0,5 e 5,0µg/l para aflatoxina M₁ no leite fluído e em pó respectivamente (BRASIL, 2002). Este limite é comparável aos estabelecidos por outros países e recomendado

pela Organização Mundial da Saúde e pela Organização para Alimentação e Agricultura (FONSECA, 2004).

2.6.3 Métodos de Análise

Vários métodos têm sido usados para análise de aflatoxinas, mas a análise individual de micotoxinas é um trabalho difícil, pois são conhecidos mais de 300 compostos e é comum uma toxina estar presente em concentrações mínimas em uma matriz orgânica complexa. A maioria das micotoxinas é analisada por cromatografia em camada delgada. No entanto, o alto poder de separação e melhores parâmetros de exatidão e precisão da cromatografia líquida de alta eficiência têm como consequência um aumento do uso deste método. Os métodos para análise química são, em geral, seletivos e poucos são realmente específicos (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

As aflatoxinas têm sido detectadas por técnicas físico-químicas e biológicas (RODRIGUEZ-AMAYA, 1989). Dentre as técnicas físico-químicas estão a cromatografia (camada delgada, líquida de alta eficiência e gasosa) e as técnicas de fluorodensitometria e espectrofotometria. As técnicas biológicas incluem os bioensaios (cultura de tecidos, animais e microorganismos) e imunoenaios (radioimunoensaio, cromatografia de afinidade e “*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*” - ELISA) (OLIVEIRA; PRADO e JUNQUEIRA, 2000).

Os métodos imunológicos têm sido largamente utilizados na pesquisa das aflatoxinas, devido à sua sensibilidade, especificidade, rapidez, simplicidade e baixo custo. O teste ELISA detecta e amplifica a reação antígeno-anticorpo pela ligação covalente entre enzima-anticorpo ou enzima-analito, cuja presença é subsequente determinada pela adição de enzima no substrato (OLIVEIRA; PRADO e JUNQUEIRA, 2000). Porém, a alta especificidade e seletividade do ELISA, aliada ao fato de muitas micotoxinas possuírem estruturas químicas afins, podendo com isso, haver a possibilidade de ocorrer a reação cruzada com anticorpos produzidos para uma determinada aflatoxina, com outras micotoxinas, que podem aparecer ao mesmo tempo, dentro do mesmo grupo (LINO, 1998).

Entre os métodos modernos de análise, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido a sua facilidade em efetuar a separação, identificação e

quantificação das espécies, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como, por exemplo, a espectrometria de massas (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1995).

Em todas as separações cromatográficas, a amostra é transportada por uma fase móvel, que pode ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico. Essa fase móvel é então forçada através de uma fase estacionária imiscível fixa colocada na coluna ou em uma superfície sólida (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

São vários os critérios usados para a classificação das diferentes modalidades de cromatografia, sendo os mais comuns relacionados a técnicas empregadas, ao mecanismo de separação envolvido e aos diferentes tipos de fases utilizadas (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1995).

Gases ou substâncias volatilizáveis podem ser separadas utilizando-se a técnica denominada “cromatografia gasosa”, atualmente, uma das técnicas de análise de maior uso. É utilizada para a separação e quantificação de produtos diversos, podendo também ser usada como técnica de identificação, em casos especiais, principalmente quando acoplada a um espectrômetro de massa ou outro detector qualitativo (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1995).

A cromatografia gasosa apresenta a necessidade de volatilização das substâncias analisadas a uma temperatura que não as leve a uma decomposição ou degradação térmica no equipamento. Como as micotoxinas possuem um ponto de ebulição alto, há uma restrição na utilização direta desta técnica sem a utilização de derivatizações químicas prévias.

A análise de substâncias não volatilizáveis à temperaturas de trabalho da cromatografia gasosa ou muito polares são preferencialmente analisadas por CLAE. Várias pesquisas têm avaliado a fase normal da CLAE para análise de aflatoxinas, porém, outras investigações têm usado a fase reversa da CLAE que produz maior reprodutibilidade nas separações por que o sistema de solventes não é afetado por mudanças ambientais (BEEBE, 1978).

Espectrômetros de massa são disponíveis acompanhados com sistemas de cromatografia a gás ou líquida de alta eficiência, permitindo a separação de componentes de misturas complexas (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Segundo SKOOG; HOLLER; NIEMAN (2002), a espectrometria de massa é talvez a mais amplamente aplicável de todas as ferramentas analíticas disponíveis

aos cientistas, tendo em vista que esta técnica é capaz de fornecer informações sobre: (1) composição quantitativa e qualitativa de amostras inorgânicas e orgânicas em misturas complexas; (2) a estrutura de uma ampla variedade de espécies moleculares complexas; (3) composição e estrutura de superfícies sólidas.

O uso de um espectrômetro de massas acoplado ao cromatógrafo a gás (CG-EM) permite a identificação positiva de quase todos os compostos (exceto isômeros), a nível de microgramas, mas o equipamento possui um preço bastante elevado, o que limita sua aplicação (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1995).

A cromatografia em camada delgada é a mais simples e mais econômica das técnicas cromatográficas quando se pretende separação rápida e identificação visual. Tradicionalmente é um método de análise qualitativa, mas pode ser utilizada como um método quantitativo de análise, utilizando-se a densitometria, que consiste em determinar a área e a intensidade da mancha, a fluorescência e radioatividade, para substâncias que apresentarem estas características (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1995).

A extração depende das propriedades físico-químicas dos produtos contaminados, devido à diversidade da natureza dos produtos que podem estar contaminados, não sendo apenas um método adequado para extração de todos os produtos (JAIMEZ, 2000).

A eficiência na extração da micotoxina depende do bom contato interno entre o solvente e a amostra. Muitas micotoxinas são facilmente solúveis em vários solventes orgânicos, mas pouco solúveis em água. A extração é freqüentemente aumentada pela água, que no caso de cereais, por exemplo, “dilata e amolece” as células, facilitando a penetração e a extração pelos solventes orgânicos (SABINO, 1995). Amostras ricas em lipídios exigem normalmente a retirada dos mesmos. Isso pode ser feito antes, durante ou após a extração. Hidrocarbonetos alifáticos como o hexano é um solvente adequado para tal (SABINO, 1995).

A seleção de um determinado solvente extrator depende do tipo de detecção cromatográfica. Muitos outros fatores, entretanto, devem ser observados tais como: o produto vegetal, a estabilidade, as substâncias interferentes, o custo e o descarte do resíduo (ROSA, 1995).

As aflatoxinas são solúveis em solventes levemente polares e insolúveis em solventes completamente apolares, normalmente são extraídas usando-se uma

mistura de solventes orgânicos entre os quais acetona, clorofórmio ou metanol (JAIMEZ, 2000).

Como solventes extratores, em geral o clorofórmio e o diclorometano são os mais aceitos, exceção feita aos métodos imunoquímicos, que não são sensíveis aos solventes clorados.

2.6.3.1 Amostragem

O objetivo da amostragem é obter porção representativa do lote de grãos, com o intuito de indicar sua natureza, qualidade e tipo. Essa amostra deverá ter características similares, em todos os aspectos, às médias do lote do qual foi retirada, pois a quantidade de grãos a ser analisada é, em geral, muito pequena em relação ao tamanho do lote que se supõe representar (CASEMG, 2005).

A contaminação de produtos agrícolas com micotoxinas não esta presente de maneira uniforme no mesmo lote. Por esta razão existe variação na determinação de micotoxinas de amostras do mesmo lote, fato este que dificulta a concentração atual destas em um mesmo lote (PIEIDADE, 2002).

Pelo fato das partículas contaminadas não serem distribuídas de maneira uniforme por todo o lote, as amostras devem ser resultado de um acúmulo de várias pequenas porções tomadas de diferentes locais por todo o lote (BAUWIN e RYAN², 1982; HURBURGH e BERN³, 1983 citado por WHITAKER, SLATE e JOHANSON 2005).

O procedimento para teste de micotoxinas geralmente consiste de 4 passos conforme preconizado por WHITAKER, SLATE e JOHANSON (2005): colheita da amostra, moagem, sub-amostragem da amostra moída e análise.

Para determinação das aflatoxinas nos alimentos é de suma importância a correta colheita da amostra do substrato a ser examinado (MALLMAN; SANTÚRIO e WENTZ, 1994).

² BAUWIN, G.R e H.L. RYAN. 1982. Sampling inspection and grading of grain. In: Storage of cereal grains and their products, Vol 5 (C.M. Christensen, ed). Am Assoc.Cereal Chem., tpaul, Minnesota , p. 115

³ HURBURGH, C.R. e C.J. BERN. 1983. Sampling corn and soybeans.1. Probing method, Trans. Am.Soc. Agric. Engineers.

As amostras deverão ser tomadas aleatoriamente da quantidade total do substrato, isto é, após sub-amostragem de todo o lote de grãos ou rações estas são misturadas e daí retirada uma amostra para análise (FONSECA, 1991).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Amostras de arroz

O arroz *Oryza sativa* L, é o produto maduro, limpo, são e seco, que submetido a processo de beneficiamento, encontra-se desprovido de sua casca e/ou tegumento (KAIMOTO e FERREIRA, 2001).

As amostras foram coletadas de diferentes locais do lote de arroz beneficiado polido tipo 1, armazenado no 5º Batalhão de Suprimento do Exército Brasileiro, Curitiba (Pr) no período de fevereiro a abril de 2004.

O armazém do 5º Batalhão de Suprimento é tipicamente um armazém convencional, que se constitui numa unidade armazenadora de fundo plano e compartimento único, adequado à estocagem de produtos, normalmente em “sacos”, “fardos”, “caixas” e “pallets”. Como é uma unidade destinada à armazenagem de vários artigos, o aproveitamento do espaço é feito através da divisão do mesmo em alas ou lotes para cada artigo ou grupo de artigo, como são denominados os tipos de alimentos dentro das unidades militares. Essa destinação deve ser flexível para atender a dinâmica de armazenagem rotativa.

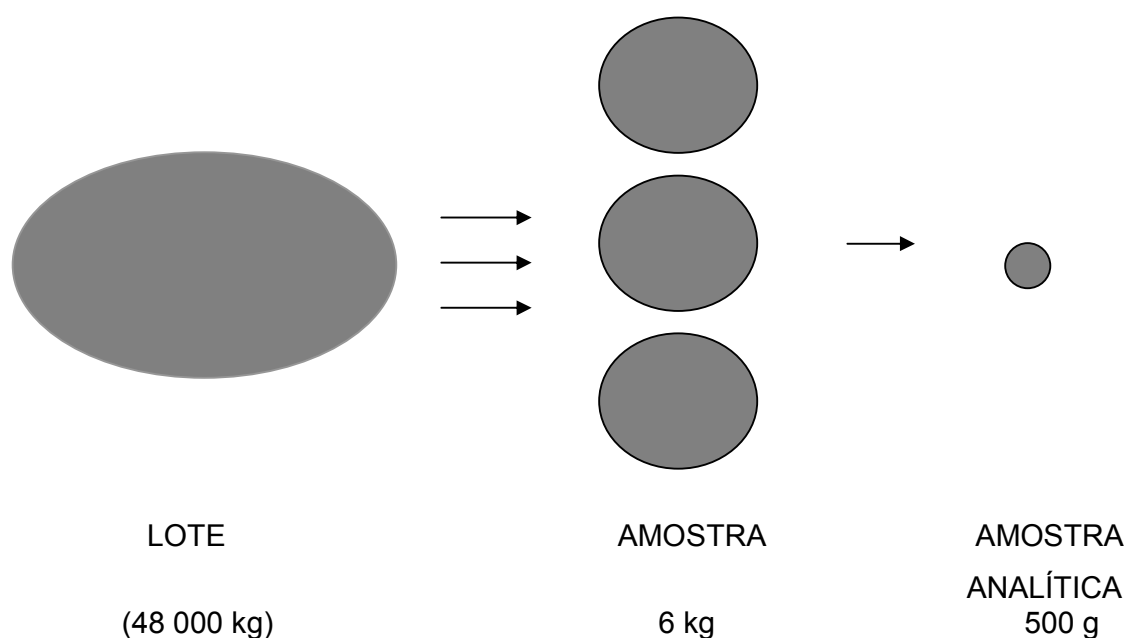
Tendo em vista estes fatores, os espaços dentro de um armazém não devem ser ocupados aleatoriamente, subordinando-se, tanto quanto possível a algumas características próprias passíveis de se alterar como no caso do arroz, a umidade.

Foi utilizada a metodologia proposta por FONSECA (1991) que sugere a utilização de critérios de amostragem com um expoente fracionário para os lotes, em que, para produtos ensacados emprega-se a seguinte fórmula: $N = 3\sqrt{n}$, onde N é o número mínimo de sacos a serem amostrados e n o número de sacos que compõe o lote.

As amostras analíticas foram obtidas de um total de 48000 kg divididos em 10 lotes de 4800 kg, retiradas de sacos de 50 kg.

Deste lote, foram obtidas amostras maiores do que as desejáveis para análise, sendo então misturadas, moídas, homogeneizadas e subdivididas até obtenção das amostras de tamanho desejadas conforme o exemplo da figura 4. Em seguida, as amostras sofreram processo de quarteamento para tomada de amostra analítica, que somaram um número total de 30 amostras de 500g e foram armazenadas a -18°C .

FIGURA 4 - AMOSTRAGEM DE ARROZ PARA PESQUISA DE AFLATOXINA



A amostra analítica foi removida de uma grande amostra, que é o acúmulo de pequenas porções tomadas de diferentes locais do lote (adaptado de WHITAKER; SLATE; JOHANSON, 2005). Posteriormente, algumas amostras foram contaminadas com soluções padrão das aflatoxinas para ensaios de recuperação.

3.1.2 Equipamentos e reagentes:

3.1.2.1 Cromatografia em camada delgada:

- Moinho marca Perten Instruments 3600

- Balança analítica METLER AB 204
- Liquidificador marca SKYNSEM
- Vidrarias de laboratório
- Papel de filtro plissado
- Cromatoplaça de sílica gel 60, 20x20 cm, 0,25 mm de espessura , sem indicador de fluorescência marca MERCK
- Microseringa de 10 μ l e 25 μ l marca HAMILTON
- Agitador de tubos tipo VORTEX
- Câmara de UV 366 λ (Cromatoview) PRODIL, com lâmpada de ultravioleta de Comprimento de onda longo (365 nm).
- Banho maria
- Pipetador automatico 20 – 200 μ l e 100 - 1000 μ l
- Metanol, marca MERCK
- Clorofórmio, marca MERCK
- Celite 545 marca SINTH
- Cloreto de potássio 4%
- Éter etílico pa, marca MERCK
- Ácido trifluoroacético (TFA)
- Padrões de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ marca SIGMA ALDRICH CO solubilizados em Tolueno, acetronitrila (98:2) preparado segundo AOAC, 17th 2000

3.1.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência:

- Sistema de cromatografia líquida MERCK – HITACHI “LA CHROM”
- Detector de fluorescência L 7485
- Bomba de injeção L 7100
- Auto sampler L 7250
- Interface D 7000
- Reator pós – coluna KOBRA CELL
- Colunas de imunoafinidade Aflatest – P marca VICAM, para fluorímetro e HPLC.

- Liquidificador marca SKYNSEM
- Filtro de papel plissado
- Sistema de filtração a vácuo
- Coluna C18
- Metanol, grau HPLC marca SINTH
- Acetonitrila, grau HPLC marca SINTH.
- Ácido nítrico 65%
- Brometo de potássio marca MERCK
- Cloreto de Sódio
- Água destilada deionizada, e ultra puro grau HPLC.

Todos reagentes utilizados foram grau PA (para análise), com exceção dos solventes para cromatografia líquida que foram grau HPLC.

3.2 MÉTODOS

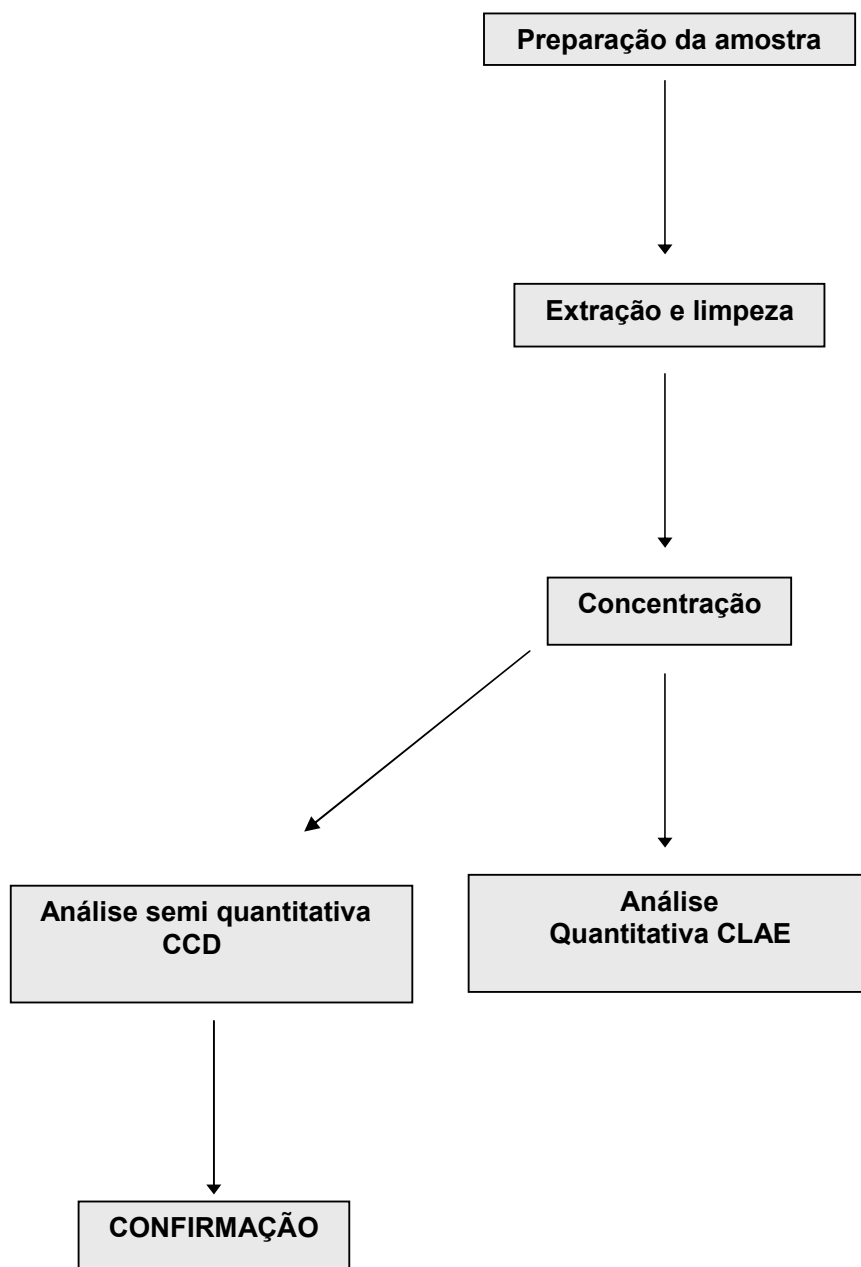
As amostras foram analisadas pelos métodos de cromatografia líquida de alta precisão (CLAE) e cromatografia em camada delgada (CCD).

As análises por cromatografia líquida de alta precisão (CLAE) foram realizadas nos equipamentos do Laboratório de Alimentos (LABA) do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), no período de julho a outubro de 2004.

As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas no Laboratório de Inspeção de Alimentos e Bromatologia do 5º Batalhão de Suprimentos do Exército Brasileiro, localizado na cidade de Curitiba (Pr), no período de março a junho de 2004. Este Batalhão possui além do laboratório de análise de alimentos, depósito e câmaras frigoríficas para armazenagem da alimentação destinada ao consumo de militares da 5ª Região Militar do Exército, que é composta pelos estados do Paraná e Santa Catarina.

As amostras analíticas foram preparadas de acordo com o diagrama de fluxo a seguir apresentado na figura 5.

FIGURA 5 - DIAGRAMA DE FLUXO DE ANÁLISE DE AFLATOXINAS



3.2.1 Umidade Relativa do Ar, Temperatura Ambiente e Umidade.

Foram medidas, por meio de leitura diária, a média de umidade relativa do ar (URA) e da temperatura média pelo termohigrômetro durante o período de

armazenagem do produto. Neste mesmo período foi feito um levantamento das condições de temperatura e umidade na cidade de Curitiba com dados da SIMEPAR.

A determinação de umidade da amostra foi realizada pelo método gravimétrico (IAL, 1985), sendo o cálculo realizado pela seguinte fórmula:

$$\text{Umidade a } 105^{\circ}\text{C (p/p)} = (P \times 100) / A$$

Onde:

P= perda de peso.

A= peso da amostra.

3.2.2 Cromatografia por Camada Delgada

A determinação de aflatoxinas foi realizada segundo o método por CCD de SOARES e RODRIGUEZ - AMAYA (1989), que se fundamenta na extração de toxinas com solvente orgânico (metanol) e solução de cloreto de potássio 4% (9:1); purificação do extrato por precipitação com clarificante (sulfato de cobre 10%); utilização de agente filtrante (celite) e partição líquido – líquido utilizando solvente orgânico (hexano) para desengorduramento, se necessário, e clorofórmio (extração). A quantificação das micotoxinas foi realizada por comparação visual da intensidade da fluorescência apresentada pela amostra em comparação com os padrões sob luz UV 365 nm.

O procedimento analítico se iniciou com a pesagem de 50 g da amostra, adicionada de 270 ml de metanol e 30 ml de KCl 4%, e agitação por 5 minutos em vortex, filtração em papel de filtro pregueado e coleta de 150 ml do filtrado.

O passo seguinte consistiu na purificação do extrato, realizada com a adição de 150 ml de clarificante (sulfato de cobre 10 %). Adicionou-se 50 cm³ de celite, homogeneizando e aguardando 10 minutos, seguiu-se filtração novamente em papel de filtro pregueado, e coletados 150 ml do filtrado. Esta alíquota, com a qual é feita a partição líquido-líquido, foi transferida para um funil de separação com 150 ml de água deionizada, e acrescida de 10 ml de clorofórmio procedendo a uma agitação suave por 3 minutos. Aguardou-se 5 minutos para que as camadas se separassem.

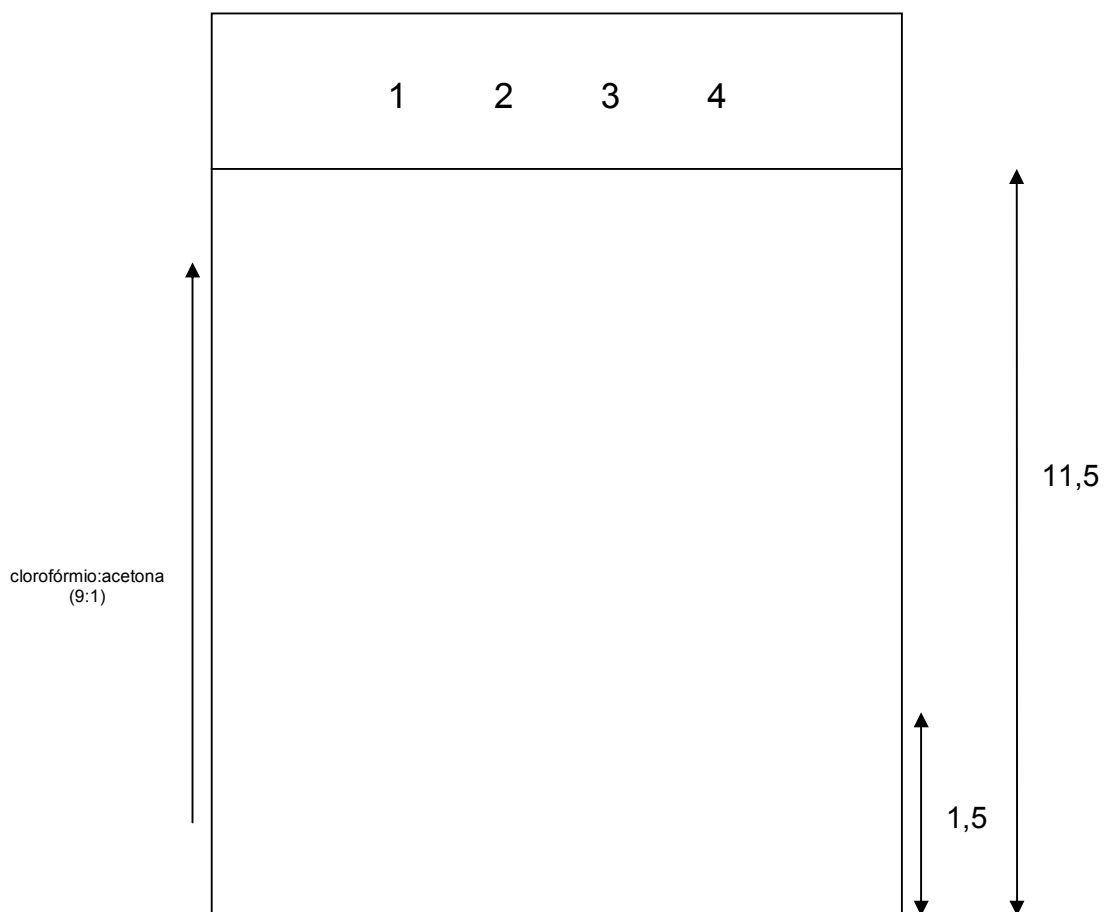
Recolheu-se o clorofórmio em copo béquer de 20 ml e retirou-se uma alíquota de 5ml em tubo âmbar. A seguir, a operação foi repetida com mais 10 ml de clorofórmio. Juntou-se a segunda alíquota de 5ml da fase de clorofórmio no mesmo tubo âmbar. Em seguida, o tubo foi levado para evaporação em banho Maria (40 °C, sob fluxo de nitrogênio).

Para detecção (“screening”) e confirmação, o extrato seco foi ressuspenso em 300 µl de tolueno, solubilizado em ultrassom por 30 segundos, e a verificação da presença de aflatoxinas foi feita aplicando sobre a placa de sílica gel 5µl do extrato em placa unidimensional, como mostra a figura 5. Na mesma placa, aplicou-se o padrão. O desenvolvimento da corrida foi realizado por 10 cm, em cuba saturada, com clorofórmio: acetona (9:1), deixando a placa secar naturalmente e visualizando sob luz UV 365 nm.

Após observação, as placas dos materiais analisados com manchas fluorescentes semelhantes ao padrão na cor e com o mesmo deslocamento (R_f), foram submetidas à confirmação para aflatoxinas B₁ e G₁, tratando-se um ponto de aplicação do material e do padrão com uma gota de ácido trifluoroacético (TFA). Procurou-se na placa manchas fluorescentes semelhantes aos padrões na cor e R_f . Nos extratos e padrões tratados com TFA, o R_f difere aproximadamente 1/3 em relação ao R_f da toxina não derivatizada (TECPAR, 2002)

A figura 6 apresenta um esquema de uma placa unidimensional em cromatografia em camada delgada antes do desenvolvimento em separação cromatográfica.

FIGURA 6 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DE PLACA UNIDIMENSIONAL EM CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA



Onde:

1- ponto de aplicação do material

2- ponto de aplicação do padrão de aflatoxinas

3- ponto de aplicação do material + TFA

4- ponto de aplicação do padrão de aflatoxinas + TFA

FONTE: TECPAR, 2001

3.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Esta metodologia fundamenta-se na extração de aflatoxinas usando uma mistura de metanol e água isolados e concentrados por meio de uma coluna de imunoafinidade. As aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ foram separadas por cromatografia

líquida e fase móvel água/ acetonitrila/ metanol (3:1:1) acrescidos de 119 mg de brometo de potássio e 350µl ácido nítrico 65%, fluxo de 1,0 ml/min, usando uma coluna RP18. Após a separação, as aflatoxinas foram derivatizadas em um reator pós-coluna eletroquímico marca KOBRACELL e examinados por detector de fluorescência com Comprimentos de onda 360nm e 425 nm para B₁ e B₂ e 455nm (em) para G₁ e G₂.

3.2.3.1 Extração

Para o procedimento analítico, a extração da amostra foi realizada pesando-se 25 g da mesma com 5 g de sal (NaCl), adicionada de 125 ml de metanol:água (70:30 v/v), agitando em liquidificador por 2 minutos e filtrando em filtro de papel plissado. Em seguida, foi realizada a diluição do extrato pipetando-se 15 ml do extrato filtrado adicionado de 30 ml de água destilada, este extrato foi filtrado através de filtro de microfibra.

3.2.3.2 Extração de fase sólida por cromatografia de afinidade

O passo seguinte, denominado de extração em fase sólida por cromatografia de afinidade, foi realizado para minimizar a interferência de compostos co-extraídos de alimentos onde ocorrem micotoxinas. Foi feito passando 15ml do extrato filtrado (15=1g de amostra) completamente através de uma coluna Aflatest-P com anticorpos específicos para aflatoxinas, sendo que, neste estágio, as aflatoxinas se ligam aos anticorpos da coluna a um fluxo de cerca de 1-2 gotas/segundo.

A coluna foi lavada com 10 ml de água destilada a um fluxo de cerca de 2 gotas /segundo. Em seguida, eluiu-se as aflatoxinas da coluna de afinidade pela passagem de 1,0 ml de metanol grau HPLC, a um fluxo de cerca de 1-2 gotas/segundo coletando a seguir toda a amostra eluída em cubeta de vidro. Esta amostra foi seca por evaporação em banho maria (40 °C, sob fluxo de nitrogênio). Ao final a amostra foi injetada no equipamento de HPLC. A figura 7 apresenta o esquema de procedimento para análise de aflatoxinas utilizando limpeza matricial com extração em fase sólida com imunoafinidade.

FIGURA 7 - PROCEDIMENTO GERAL



3.2.3.3 Fase móvel

Para o funcionamento em condições normais do equipamento de CLAE a fase móvel foi preparada com água: acetonitrila: metanol (60:20:20 v/v/v). Desta solução, utilizou-se uma alíquota de 15 ml para posterior ressuspensão do extrato e realização da curva de calibração. Após a retirada desta alíquota, foi adicionado a esta, 119 mg de brometo de potássio e 350 µl de ácido nítrico 4M completando-se assim a solução de fase móvel.

3.2.3.4 Preparo de soluções para curva de calibração

Foram preparadas as soluções utilizadas para curva de calibração. Para obtenção da solução mãe, foi removida a proteção central do frasco com o padrão sólido sem remoção das tampas originais, este procedimento tem por objetivo evitar a disseminação de partículas de toxinas. A seguir, foi injetado no frasco, solvente (tolueno/acetonitrila 9:1) e solubilizados em agitador de tubos.

O volume obtido no frasco foi transferido para balão volumétrico âmbar, completando-se o volume (100ml) com solvente. Foi obtida a partir deste procedimento, solução mãe com 10 ppm aproximadamente e estocadas em freezer. Cada solução de aflatoxina foi diluída para a concentração de 1 ppm e medida essa concentração pela Absortividade molar (ϵ) máxima.

As soluções foram submetidas à espectrofotometria de ultravioleta em comprimento de onda de 350 nm. A determinação das concentrações individuais das aflatoxinas nesta solução de trabalho, foi feita de acordo com as absorbâncias obtidas e os solventes empregados utilizando a metodologia prevista pela "Association of Official Analytical Chemists" (AOAC, 2000), 971.22c, que emprega a seguinte fórmula:

$$\mu\text{g aflatoxina/ ml} = \frac{A \times PM \times 1000}{\epsilon}$$

Onde:

A: Absorbância obtida,

PM: Peso molecular,

ϵ Absortividade molar

Os valores usados para o cálculo das aflatoxinas, estão na tabela 3

TABELA 3 - VALORES DE PESO MOLECULAR E ABSORTIVIDADE MOLAR DE AFLATOXINAS

Aflatoxina	Solvente	PM	ϵ
B ₁	tolueno/acetonitrila (9:1)	312	19300
B ₂	tolueno/acetonitrila (9:1)	314	21000
G ₁	tolueno/acetonitrila (9:1)	328	16400
G ₂	tolueno/acetonitrila (9:1)	330	18300

PM: peso molecular

ϵ : absortividade molar

As concentrações obtidas de solução mãe e trabalho estão listados na tabela 4.

TABELA 4 – CONCENTRAÇÃO DE SOLUÇÃO MÃE E SOLUÇÕES TRABALHO OBTIDAS

AFLATOXINA	SOLUÇÃO MÃE µg/ml	SOLUÇÃO TRABALHO µg/ml
B ₁	11,40	1,8
B ₂	11,56	1,7
G ₁	11,90	1,3
G ₂	11,05	1,1

Estas soluções foram pipetadas como listado na tabela 4 para um frasco volumétrico de 5 ml, em seguida, evaporadas em fluxo de nitrogênio e redissolvidas na fase móvel.

TABELA 4 - PREPARO DE SOLUÇÕES PARA CURVA DE CALIBRAÇÃO

AFLATOXINAS	CONCENTRAÇÃO	VOLUME PARA 10 PPB
B1	1,52µg/l	33µl
B2	1,49µg/l	33µl
G1	1,54µg/l	32µl
G2	1,48µg/l	34µl

A seguir, foi completado ao frasco volumétrico com fase móvel e uma série de diluições foi realizada para obtenção da curva padrão, de acordo com a tabela 5.

TABELA 5 - ALÍQUOTAS DE FASE MÓVEL, SOLUÇÃO DILUÍDA E CONCENTRAÇÃO OBTIDA PARA CLAE

ALÍQUOTA DE SOLUÇÃO DILUÍDA	ALÍQUOTA DE FASE MÓVEL	CONCENTRAÇÃO OBTIDA
750µl	750µl	5 ppb
450µl	1050µl	3 ppb
150µl	1350µl	1ppb
75µl	1425µl	0,5 ppb
15µl	1485µl	0,1 ppb

3.2.3.5 Derivatização de aflatoxinas B₁ e G₁

A derivatização consiste em transformar a substância de interesse em um derivado com características adequadas para serem analisadas. Também pode ser

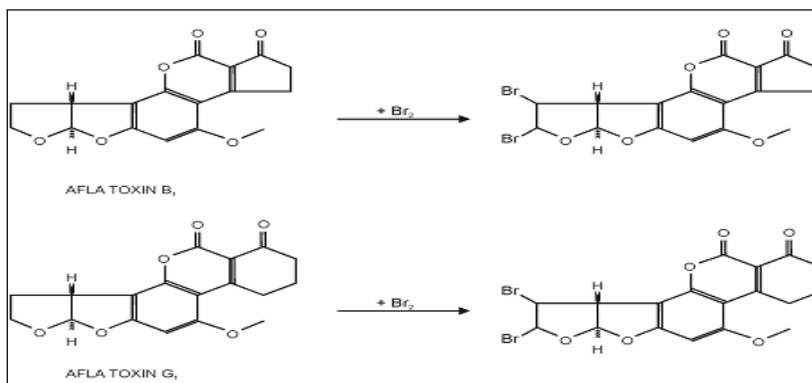
usada para a introdução de grupos específicos no sentido de aumentar a sua detectabilidade (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1995).

A detecção em pequenas quantidades da aflatoxinas em amostras por CLAE requer a derivatização das aflatoxinas B₁ e G₁ para aumentar a fluorescência natural sob luz UV e facilitar a sua detecção. Segundo JAIMEZ et al. (2000) a utilização de solventes como metanol / água ou acetonitrila / água, diminuem a fluorescência das aflatoxinas B₁ e G₁ e diferentes procedimentos para derivatização têm sido usados, entre eles o uso de ácidos fortes como o ácido trifluoroacético (TFA) e oxidantes como as cloraminas, iodo e bromo.

REIF e METZGER (1995) relatam que a detecção com derivatização pós-coluna com iodo possui duas desvantagens: necessita-se de duas bombas HPLC e demonstra uma instabilidade da solução de iodo. Para a derivatização pré-coluna com TFA, estes autores relatam ser um agente com reprodutibilidade fraca e de difícil automação.

Neste trabalho, foi realizada uma derivatização pós-coluna com bromo molecular eletroquimicamente gerado em um reator pós-coluna (KOBRA[®]CELL), resultando no aumento da fluorescência. Segundo REIF e METZGER (1995) a sensibilidade do método aumenta consideravelmente com o uso desta célula eletroquímica. A KOBRA[®]Cell (R-BIOPHARM RHÔNE LTD, 2004), gera o agente de derivatização, bromo, do brometo de potássio presente na fase móvel. A derivatização das aflatoxinas ocorre rapidamente na temperatura ambiente (Figura 8)

FIGURA 8 - DERIVATIZAÇÃO DE AFLATOXINA B₁ E G₁ UTILIZANDO KOBRA[®]CELL.



FONTE: R-BIOPHARM RHÔNE LTD, 2004.

3.2.3.6 Testes de recuperação e quantificação

Foram contaminadas amostras com soluções padrão para avaliação da determinação da exatidão do método, que é indicada pela diferença entre o valor obtido e o valor real do analito da matriz (EURACHEM..., 1998), determinada como coeficiente de recuperação e expressa em percentagem. Para o estabelecimento dos coeficientes de recuperação e limite de quantificação, soluções padrão de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ foram adicionadas às amostras e após a evaporação de solventes dos padrões as amostras foram submetidas às metodologias analíticas

Com base no multimétodo de camada delgada, proposto por SOARES e RODRIGUEZ - AMAYA (1989), foram testadas a recuperação em 3 níveis com 3; 5 e 10 µg/kg em triplicata e limite de quantificação de 3 µg/kg para AFB₁, B₂, G₁ e G₂.

Para o método de cromatografia líquida de alta eficiência, os testes de recuperação foram feitos utilizando-se os níveis de 3 e 5 µg/kg e testados os limites de quantificação de 0,5 µg/kg.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 TEOR DE UMIDADE DOS GRÃOS, UMIDADE RELATIVA DO AR E TEMPERATURA DE ARMAZENAGEM EM GRAUS CELSIUS.

Muitos fatores devem ser levados em consideração na produção de arroz, Entre estes incluem: a colheita, métodos e duração de secagem e armazenagem (KAIMOTO e FERREIRA, 2001).

Entre os fatores físicos que afetam a conservação dos grãos armazenados, pode-se citar o teor de umidade dos grãos, a umidade relativa do ar e a temperatura de armazenagem. A presença e a magnitude da contaminação dos alimentos por aflatoxinas variam em função de fatores geográficos e estacionais e também das condições em que se cultiva, colhe e armazena os produtos agrícolas. Os cultivos em zonas tropicais e subtropicais são mais propensos à contaminação do que as regiões temperadas, pois as condições ótimas para a produção de toxinas imperam nas zonas de umidade e temperaturas elevadas (MALLMAN; SANTÚRIO e WENTZ, 1994).

O armazenamento é uma das principais etapas na cadeia de produção de grãos. É um assunto de grande complexidade devido ao fato de ser multidisciplinar e de envolver uma gama muito grande de operações, equipamentos e estruturas.

O armazenamento de grãos em sacos, nos armazéns convencionais, é prática dominante no Brasil. Os grãos estocados em sacos, nestes tipos de armazéns, ficam sujeitos às variações ambientais e, em regiões úmidas, a qualidade do produto sofre grandes prejuízos pela ação de fungos. É importante conhecer todos os aspectos que influenciam a qualidade dos produtos armazenados.

Se o local de armazenagem for inadequado, há uma tendência de reumidecimento da semente mesmo ela estando seca em torno de 13% (EMBRAPA, 2005).

Segundo PEREIRA, CARVALHO e PRADO (2002) a umidade do substrato e a umidade relativa constituem pontos críticos na produção da aflatoxinas. DIENER e DAVIS (1966) relatam que a produção máxima de aflatoxinas, em grão de cereal, ocorre em umidade de 25% a 30°C.

Estas determinações foram realizadas na recepção das amostras, durante o seu armazenamento e após a coleta das mesmas para análise.

O resultado da determinação de umidade é mostrado na tabela 6

TABELA 6 - TEOR DE UMIDADE DO ARROZ ANALISADO

AMOSTRA	TEOR DE UMIDADE*	UMIDADE PERMITIDA**	S	CV(%)
Arroz beneficiado polido tipo I	12,32%	14%	0,52	4,22

S = desvio padrão

CV = coeficiente de variação

* valor médio das determinações

**valor de umidade máxima permitida pela legislação vigente

O teor de umidade do arroz foi de $12,32 \pm 0,52$. Segundo PEREIRA, CARVALHO e PRADO (2002) a população fúngica do arroz naturalmente contaminado e com umidade de 13% diminuiu significativamente durante a estocagem. A umidade do grão é também influenciada pelas condições climáticas, entre elas, umidade relativa do ar (URA) e temperatura do ambiente. As figuras 9 e 10 e tabelas 7 e 8 mostram respectivamente os valores médios de umidade relativa do ar e temperatura registrados no armazém durante período de estocagem das amostras. As figuras 11 e 12 e as tabelas 9 e 10 apresentam os valores médios de temperatura e umidade relativa do ar na cidade de Curitiba - Pr. A umidade relativa do ar média dentro do armazém apresentou-se acima da média apresentada para a cidade de Curitiba no mesmo período. Com relação à temperatura, estas apresentaram parâmetros idênticos em suas médias.

FIGURA 9 - TEOR DE UMIDADE RELATIVA DO AR DURANTE OS MESES DE ESTOCAGEM DO ARROZ

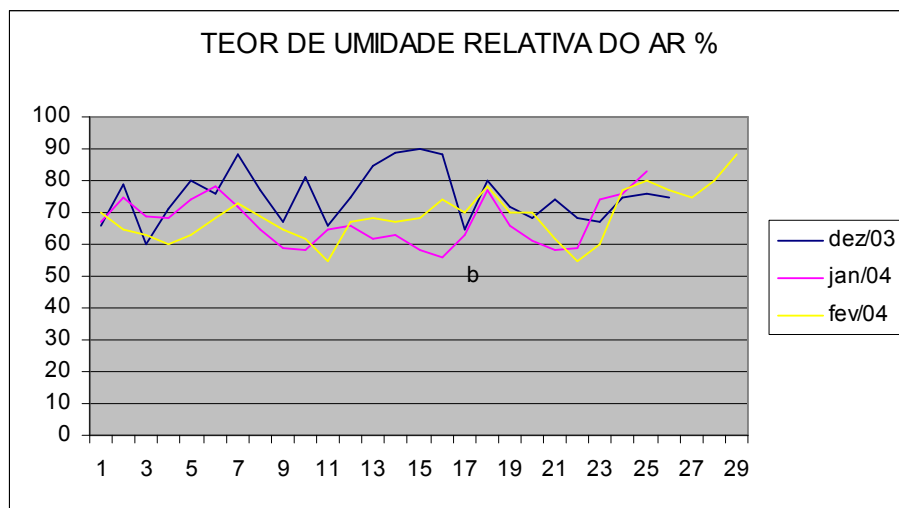


FIGURA 10 - TEMPERATURA MÉDIA OBTIDA DURANTE OS MESES DE ESTOCAGEM DO ARROZ

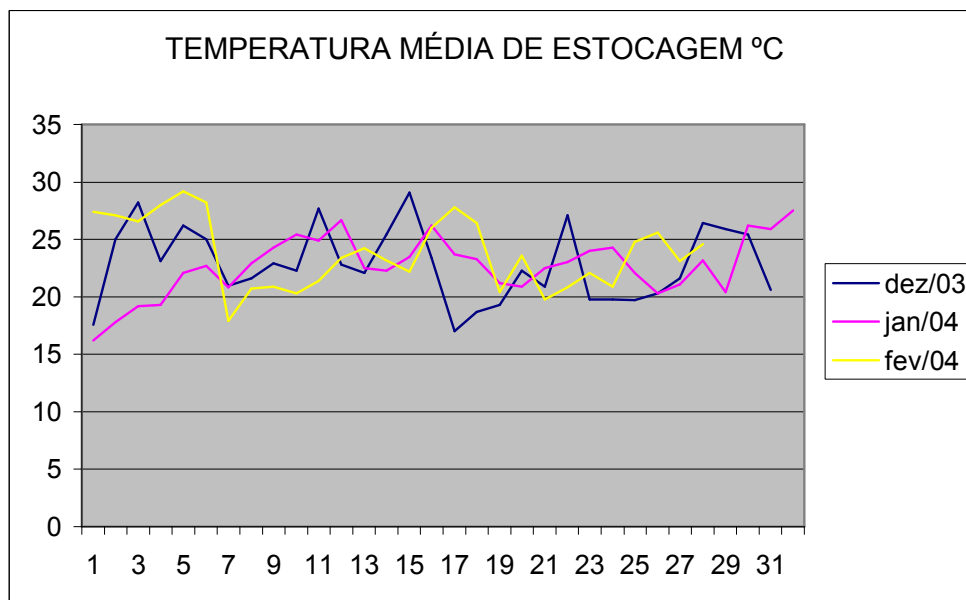


TABELA 7 - TEOR DE UMIDADE RELATIVA DO AR NO ARMAZÉM ENTRE OS MESES DE DEZEMBRO E FEVEREIRO

URA *	S	CV %
75,3 %	8,49	11,27 %

S= desvio padrão

CV= coeficiente de variação

* Valor médio obtido nas leituras realizadas

TABELA 8 - TEMPERATURA MÉDIA OBTIDA NO ARMAZÉM.

TEMPERATURA ° C*	S	CV %
23,09° C	2,96	12,8 %

S = desvio padrão

CV = coeficiente de variação

* Valor médio das leituras realizadas

TABELA 9 - TEOR DE UMIDADE RELATIVA DO AR EM CURITIBA

URA *	S	CV %
65,99 %	10,79	16,35

S= desvio padrão

CV= coeficiente de variação

* Valor médio das leituras realizadas entre dezembro de 2003 a janeiro de 2004

FIGURA 11 - TEOR DE UMIDADE RELATIVA DO AR NA CIDADE DE CURITIBA-PR

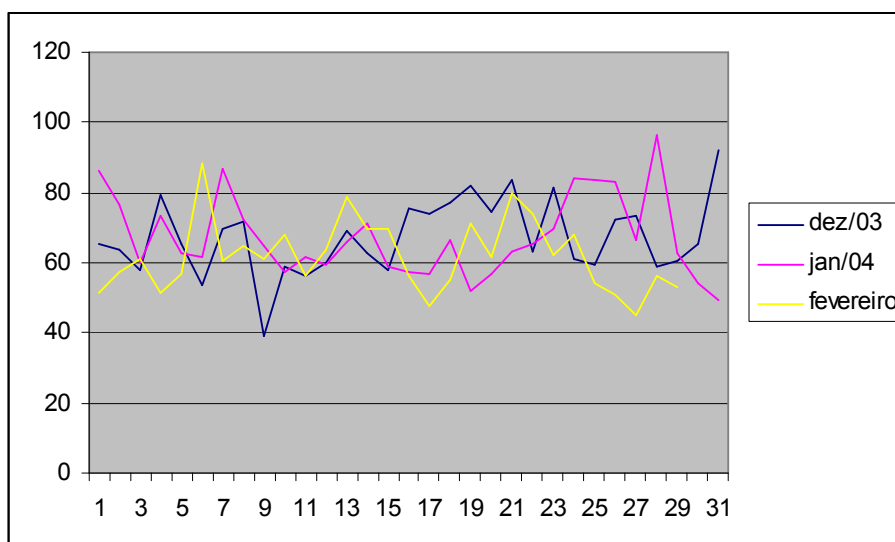


FIGURA 12 - TEMPERATURA MÉDIA NA CIDADE DE CURITIBA – PR

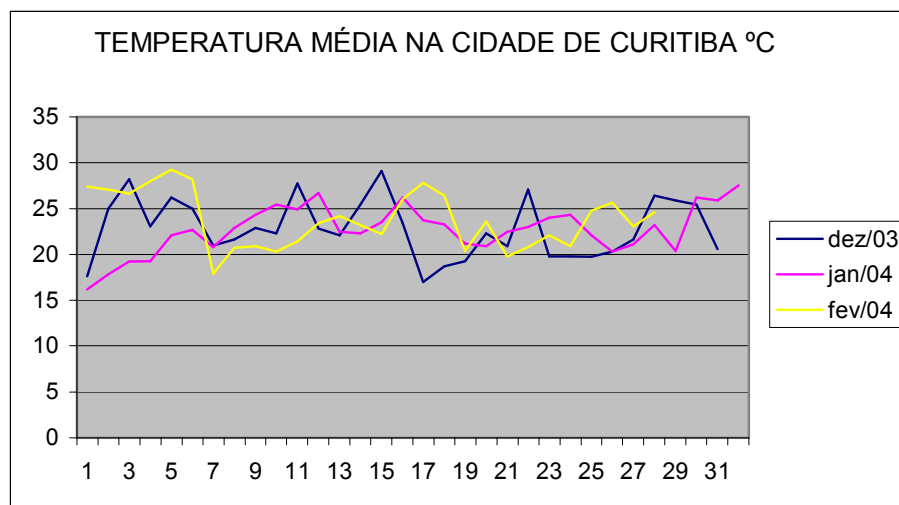


TABELA 10 - TEMPERATURA MÉDIA EM CURITIBA ENTRE OS MESES DE DEZEMBRO DE 2003 A FEVEREIRO

TEMPERATURA ° C*	S	CV %
23,1° C	2,96	12,81

S = desvio padrão

CV = coeficiente de variação

* Valor médio das leituras realizadas entre dezembro de 2003 a fevereiro de 2004

Os processos utilizados para tomada de amostras de um grande lote são extremamente importantes (WHITAKER; SLATE; JOHANSON, 2005), isto porque as partículas contaminadas não são distribuídas de forma homogênea por todo o lote.

Dentre as amostras analisadas, nenhuma apresentou teor médio de umidade acima dos limites permitidos em legislação, devendo-se levar em conta que amostras que apresentem valores acima das previstas legalmente são rejeitadas pelo Exército por força do regulamento, não sendo, portanto adquiridas. Nenhuma amostra analisada apresentou limites acima dos descritos em literatura como sendo ideais para o desenvolvimento de fungos.

Quanto às médias obtidas de umidade relativa do ar (URA) e de temperatura ambiente do armazém, estas demonstraram níveis inferiores aos ideais tanto para o desenvolvimento dos fungos *Aspergillus* e *Penicillium* (URA acima de 75% e temperatura entre 23-26°C) quanto para a produção de aflatoxina propriamente dita (URA acima de 85% e temperatura em torno de 27° C), mesmo sendo as amostras

coletadas e armazenadas na estação considerada chuvosa em meses onde normalmente há alta umidade relativa do ar e temperatura.

Os alimentos estocados pelo Exército, passam por processo de controle de qualidade, realizado pelo Laboratório de Inspeção de Alimentos e Bromatologia (LIAB), onde, são reprovados para fins de aquisição, alimentos com teores de umidade acima dos previsto por legislação, sendo no caso do grão de arroz, fator predisponente para a contaminação por fungos toxigênicos. Aliado a estes fatores, não houve durante o período de realização do experimento, longos períodos de estocagem no armazém do 5º Batalhão de Suprimento. De acordo com descrições em literatura para as condições gerais da amostra neste experimento, seria esperado como resultado neste trabalho, baixos níveis de incidência de aflatoxinas.

O monitoramento e a manutenção de limites seguros desses parâmetros asseguram a conservação dos grãos armazenados, bem como, a qualidade dos mesmos, no que se refere à contaminação do produto por aflatoxinas. Como o arroz é colhido com umidade elevada, o processo de secagem dos grãos deve ser feito de maneira rápida e eficiente antes da armazenagem. Para o armazenamento, além de grãos secos, as sacarias devem ser mantidas com boa ventilação e isentos da ação de insetos, que favorecem a disseminação de fungos e formação de bolsas de calor durante o armazenamento.

Os fungos fazem parte das principais causas de deterioração de grãos armazenados. Segundo PITTET (1998), não existem dúvidas de que altas concentrações de aflatoxinas em alimentos estão associadas ao crescimento de fungos *Aspergillus* (pós-colheita), em alimentos mal armazenados.

Além dos problemas relativos à saúde, deve-se levar em conta o impacto negativo para as exportações brasileiras tendo em vista os diferentes limites legais adotados por diversos países, em particular os europeus. Citando como exemplo, a União Européia, que adotou limites de 4ppb para o somatório das quatro aflatoxinas, e, 2ppb para Aflatoxina B₁, enquanto que no Brasil, os limites adotados são de 20 ppb para todas as aflatoxinas (BRASIL, 1996; EUROPEAN...,1998).

4.2 LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO E RECUPERAÇÃO EM CCD

Utilizando o método proposto por SOARES e RODRIGUEZ-AMAYA (1989), o limite de quantificação para arroz obtido foi de 3µg/kg para AFB₁, B₂, G₁ e G₂, SOARES e RODRIGUEZ-AMAYA obtiveram para aflatoxina B₁ 4µg/kg. Limite de quantificação é definido, segundo os autores, como a mais baixa concentração que pode ser quantificada com reprodutibilidade.

FURLONG et al. (1999) obtiveram limites de quantificação de 2,5 µg/kg para aflatoxina B₁ em arroz branco. O mesmo limite de quantificação foi encontrado para as aflatoxinas por NUNES et al. (2003).

SIMIONATO; ASTRA e SYLOS (2003) encontraram limites de quantificação de 1µg/kg para aflatoxinas B₁, B₂ e G₂ e 3µg/kg para G₁ em arroz polido.

A tabela 11 mostra os limites de quantificação obtidos para aflatoxinas utilizando o método proposto.

TABELA 11 - LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO OBTIDO PARA AFLATOXINAS (µG/KG)

	LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO
Aflatoxina B ₁	3
Aflatoxina B ₂	3
Aflatoxina G ₂	3
Aflatoxina G ₁	3

A determinação dos níveis de recuperação foi realizada com amostras contaminadas artificialmente com 3; 5 e 10 µg/kg com as quatro aflatoxinas.

Para AFB₁, as taxas médias obtidas foram de 86,8 a 99,7%; para AFB₂, 93 a 107% e para AFG₁ e AFG₂ as taxas médias obtidas foram de respectivamente 81 a 99,5% e 80 a 95,7%.

SOARES e RODRIGUEZ-AMAYA (1989) obtiveram limites de recuperação e coeficiente de variação entre 91-101% e 0-16% respectivamente para AFB₁. Deve-se considerar que em análise de traços, ou seja, µg/kg como é o caso das aflatoxinas, nível de recuperação entre 70 a 120% são aceitos, portanto os níveis obtidos estão dentro dos limites aceitáveis e os coeficientes de variação dentro do esperado, sendo considerados adequados para o monitoramento da contaminação de amostras.

Em todas as amostras contaminadas artificialmente, foram detectadas aflatoxinas. A tabela 12 apresenta os níveis de recuperação obtidos para as quatro aflatoxinas.

TABELA 12 - TAXA DE RECUPERAÇÃO DE AFLATOXINAS POR CCD

AFLATOXINA	QUANTIDADE ADICIONADA (µg/kg)	*QUANTIDADE RECUPERADA (µg/Kg)	*RECUPERAÇÃO (%)	S	CV (%)
B ₁	3	2,8	96,0	13,38	13,89
	5	4,6	86,8	18,6	21,46
	10	9,9	99,7	15,75	15,78
B ₂	3	3,2	107,0	14,69	13,73
	5	4,6	93,0	17,23	18,53
	10	10,3	103,0	28,19	27,17
G ₁	3	2,6	89,5	24,41	27,2
	5	3,9	78,0	18,92	24,25
	10	8,1	81,0	19,91	24,58
G ₂	3	2,8	95,7	14,84	15,49
	5	3,8	76,8	20,12	26,19
	10	8	80,0	21,5	26,79

S = Desvio padrão da média das recuperações

CV = Coeficiente de variação

* Valor médio em n 5

FURLONG et al. (1999), realizando levantamento de aflatoxinas, ocratoxinas e zearalenona, encontraram média de recuperação de 84% para aflatoxina B₁ em arroz branco.

SIMIONATO; ASTRA e SYLOS (2003). Encontraram taxa de recuperação de 93,3%; 103,0% e 104,1 em amostras contaminadas com respectivamente 3; 10 e 20 µg/kg para aflatoxina B₁ isoladamente e, quando realizadas com as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ encontraram taxas inferiores, principalmente com amostras contaminadas com 10 µg/kg.

FURLONG et al. (1999) afirmam que os reagentes e os procedimentos do analista também influenciam os resultados e precisam estar considerados quando se pretende implantar uma rotina de avaliação de ocorrência de micotoxinas.

Segundo SOARES e RODRIGUES-AMAYA (1989), deve ser reconhecido que o analito adicionado a um substrato não se comporta da mesma maneira que o endógeno.

4.3 OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS POR CCD

Do total de 30 amostras analisadas em duplicata, não foi verificada em nenhuma a presença de aflatoxinas. Este índice está de acordo com outros trabalhos que demonstraram pouca ou nenhuma ocorrência em amostras de arroz.

SILVA et al. (2003) pesquisaram aflatoxinas em alimentos comercializados no Distrito Federal utilizando o método recomendado pelo Instituto Adolfo Lutz e o procedimento descrito por Soares e Rodriguez – Amaya. Analisaram entre outros alimentos, 19 amostras de arroz e produtos de arroz e não encontraram amostras positivas.

NUNES et al. (2003), pesquisando arroz comercializado na região Sul do Brasil, também não encontraram a presença das micotoxinas em arroz branco.

FURLONG et al. (1999) utilizando a mesma técnica, pesquisaram aflatoxinas em 15 amostras de arroz branco e não verificaram a presença em nenhuma amostra, o mesmo resultado foi obtido por PRADO et al. (1989) e COELHO et al. (2001).

SIMIONATO et al. (2003) pesquisaram a ocorrência de aflatoxinas em 68 amostras de arroz polido, parboilizado e integral; encontraram duas amostras contaminadas com aflatoxinas B₁ com respectivamente 8,6 e 6,2 µg/kg.

O método SOARES e RODRIGUEZ-AMAYA (1989) necessitou de um tempo maior de análise em relação à cromatografia líquida, devido ao tempo de aplicação da amostra e desenvolvimento da corrida cromatográfica, no entanto, o baixo custo, a necessidade de equipamentos simples e a facilidade de operação viabilizaram as análises. O cromatograma não apresentou interferências, o extrato obtido permitiu a quantificação, não havendo necessidade de nova extração, pois durante o processo de limpeza, foi obtido um extrato claro e límpido.

Segundo COLLINS; BRAGA e BONATO (1995) a CCD é a mais simples e a mais econômica das técnicas cromatográficas quando se pretende separação rápida e identificação visual.

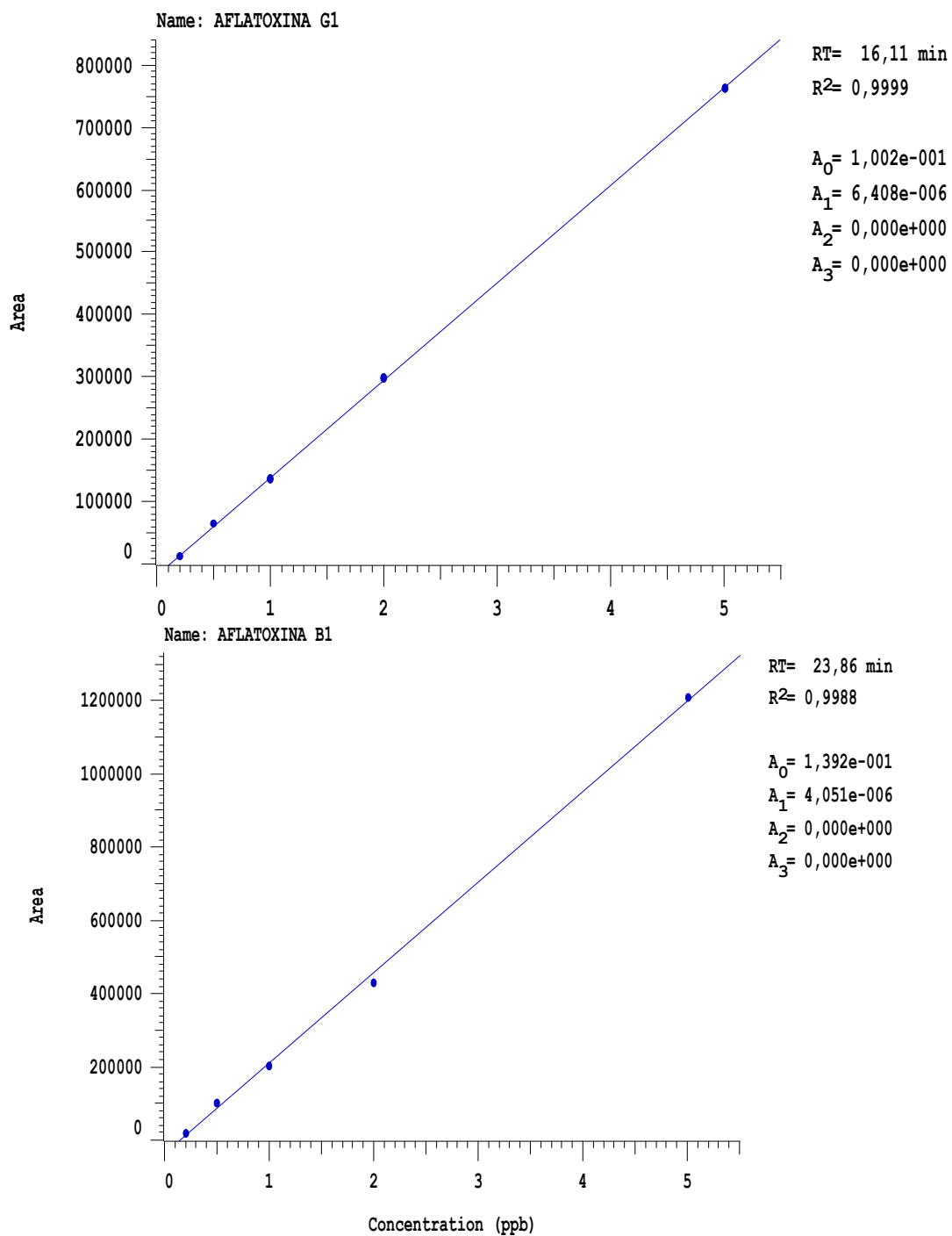
4.4 LINEARIDADE E CURVA DE CALIBRAÇÃO OBTIDAS PARA CLAE

As técnicas analíticas conhecidas como instrumentais necessitam medir alguma propriedade físico-química da amostra para correlacioná-la com sua composição, no caso dos métodos cromatográficos, a área ou altura de picos cromatográficos. A avaliação da linearidade da resposta é, na verdade, a avaliação da habilidade do sistema de detecção em apresentar resultados proporcionais à concentração do analito (EURACHEM..., 1998). As curvas de calibração correlacionam à área dos picos cromatográficos com a massa de substância eluída que chega ao detector, ela representa a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito (BRASIL, 2003). A curva obtida com esses dados deve ser uma reta que passe pela origem. As análises serão baseadas nesta curva (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes, e que, o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser $= 0,99$ (BRASIL, 2003).

A figura 13 apresenta dois gráficos de curva de calibração obtidos, onde se verifica para AFB₁ e AFG₁, a linearidade na faixa de 0,2 a 5 ppb

FIGURA 13 - GRÁFICO DE CURVA DE CALIBRAÇÃO



4.5 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO E RECUPERAÇÃO POR CLAE

Utilizando o método de cromatografia líquida de alta eficiência, o limite de quantificação foi de 0,5µg/kg para cada aflatoxina. LIPIGORNGOSON; ALI e YOSHIZAWA, (2003) encontraram um limite de “detecção” de 0,1 µg/kg para arroz beneficiado poilido, STROKA et al.⁴ (2000) citados por LIPIGORNGOSON ALI e YOSHIZAWA encontraram o mesmo limite, os mesmos autores citaram TRUCKSESS et al.⁵ (1991) e URANO et al.⁶ (1993), com limites de 5 e 0,5µg/kg respectivamente.

Limite de detecção é definido como o menor teor de um composto que pode ser detectado, mas não quantificado, podendo ser estimado em 1/5 do valor obtido para limite de quantificação.

A determinação dos níveis de recuperação foi realizada com amostras contaminadas artificialmente com 3 e 5 µg/kg com as quatro aflatoxinas. Para AFB₁, as taxas médias obtidas foram de 95,33 a 99,66%; para AFB₂, 92,8 a 112,2% e para AFG₁ e AFG₂ as taxas médias obtidas foram de respectivamente 91 a 99,13% e 81,63 a 86,46%.

Quanto aos coeficientes de recuperação obtidos, as amostras contaminadas com 5µg/kg apresentaram maior homogeneidade ao ser observado que as amostras contaminadas artificialmente com 3 µg/kg apresentaram coeficientes de variação acima das amostras contaminadas com 5µg/kg. Segundo GIL (1987), muitas características biológicas apresentam coeficientes de variação na faixa de 5 a 50%. Estes dados são apresentados na tabela 13.

⁴ STROKA, J. et al. **J.AOAC int.**, 83,320-340 (2000)

⁵ TRUCKSESS, M. W. et al. J. Assoc. off. **Anal. Chem.**, 74, 81-88 (1991)

⁶ URANO, T., TRUCKSESS, M. W., PAGE, S.W., **J. Agric. Food Chem.**, 41, 1982-1985

TABELA 13 - TAXA DE RECUPERAÇÃO DE AFLATOXINAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

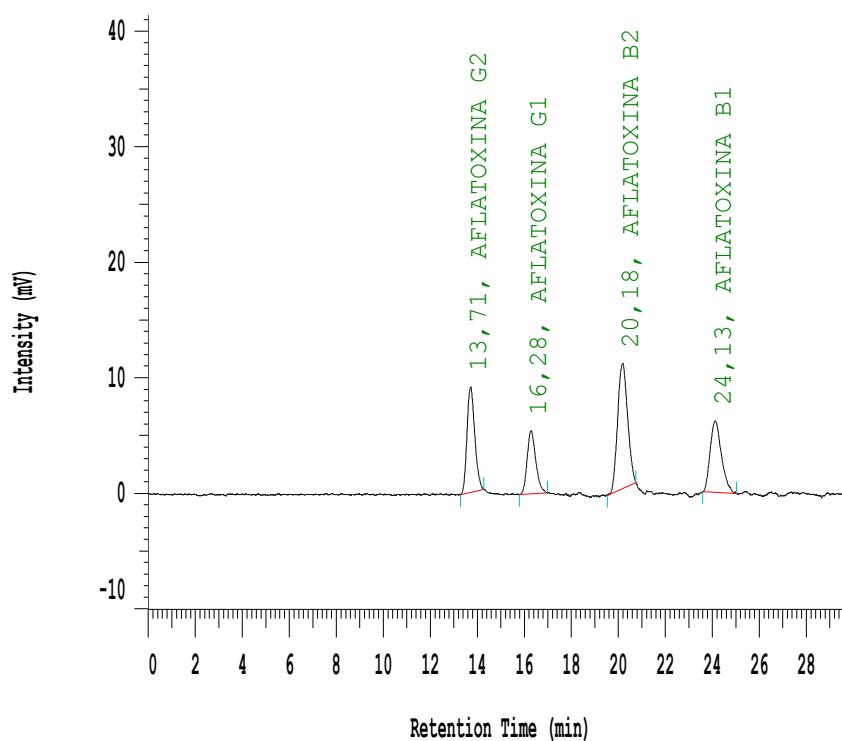
AFLATOXINA	QUANTIDADE ADICIONADA (µg/Kg)	QUANTIDADE RECUPERADA (µg/Kg)	RECUPERAÇÃO (%)	S	CV
B ₁	3	2,85	95,33	20,55	21,55%
	5	4,98	99,66	10,59	10,62%
B ₂	3	3,36	112,2	29,11	25,94%
	5	4,64	92,8	11,32	12,19%
G ₁	3	2,97	99,13	17,32	19,03%
	5	4,55	91	17,20	17,35%
G ₂	3	2,44	81,63	14,30	17,51%
	5	4,32	86,46	12,79	14,79%

S =Desvio padrão

CV= Coeficiente de variação

LIPIGORNGOSON e YOSHIKAWA (2003) utilizando o método cromatografia líquida / colunas de imunoafinidade obtiveram limites de recuperação de 95,101,112 e 110% para amostras contaminadas com 0,2 µg/kg e 82, 79, 89 e 83% em amostras com contaminação de 0,5µg/kg respectivamente.para AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂. A figura 14 mostra o cromatograma com amostra artificialmente contaminada.

FIGURA 14 - CROMATOGRAMA DE AMOSTRA CONTAMINADA ARTIFICIALMENTE



4.6 OCORRÊNCIA DE AFLATOXINAS POR CLAE

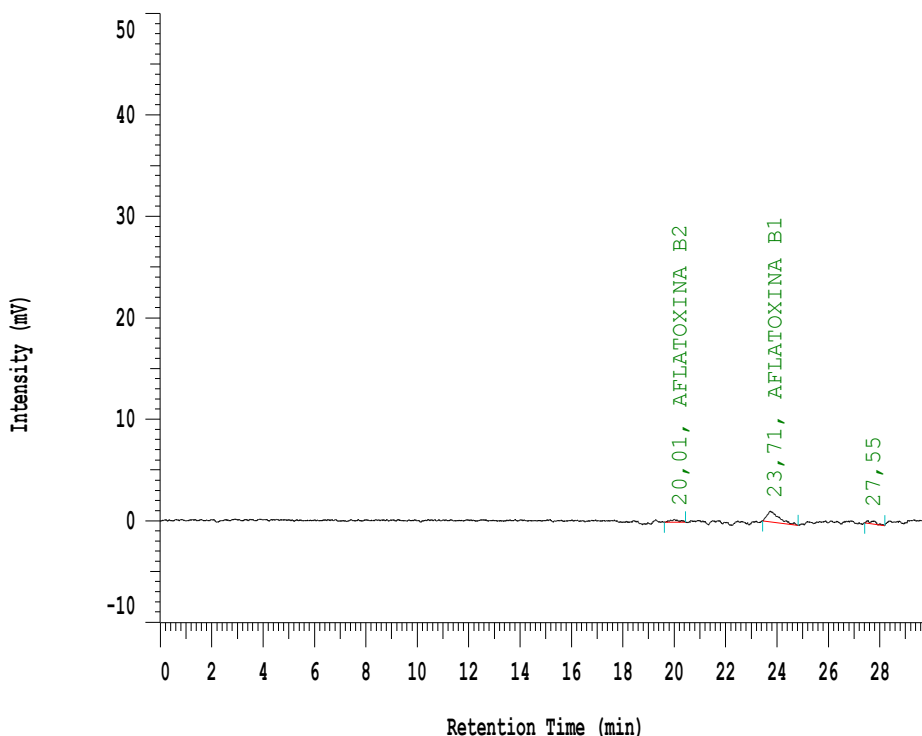
A tabela 14 apresenta os resultados obtidos após análise. De um total de 26 amostras analisadas, 6 (23,07%) apresentaram positividade para aflatoxina B₁ com níveis variando entre 0,54 a 2,04 µg/kg e 1 (3,84%) apresentou presença de aflatoxina B₂ sendo que, nenhum atingiu o limite acima do recomendado pela legislação do Mercosul (20µg/Kg) e Brasil.

TABELA 14 - INCIDÊNCIA DE AFLATOXINAS EM ARROZ PELO MÉTODO DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

Amostra nº	AFB ₁ concentração (ng/g)	AFB ₂
01	0,564	
07	0,585	
15	0,547	
16	0,603	
21	1,841	1,845
22	2,04	

A figura 15 mostra o cromatograma de uma das amostras em que se detectou a contaminação natural de aflatoxina B₁. A concentração encontrada foi de 0,547(ng/g).

FIGURA 15 - CROMATOGRAMA DE CONTAMINAÇÃO NATURAL EM ARROZ POR AFLATOXINA B₁



Segundo BEEBE (1978), as vantagens do método de cromatografia líquida são velocidade, precisão, sensibilidade, seletividade e a confirmação química imediata de AFB₁ e AFG₁.

LIPIGORNGOSON; ALI e YOSHIZAWA (2003) utilizando o método de colunas de imunoafinidade-cromatografia líquida para pesquisa de aflatoxinas em arroz, detectaram a presença de AFB₁ em 25% das amostras com concentrações variando entre 0,1-0,3µg/kg. Segundo os mesmos autores, a contaminação por aflatoxinas em arroz polido no Japão foi resultado da importação do produto, particularmente de países de clima tropical.

No Japão, os estudos sobre micologia e contaminação por aflatoxinas em arroz têm sido conduzidos desde aproximadamente 1957, no entanto, dados acurados usando métodos sensíveis, entre os quais CLAE ainda não foram avaliados (LIPIGORNGOSON; ALI e YOSHIZAWA, 2003).

DILKIN et al. (2004) analisaram os níveis de aflatoxinas em arroz com o objetivo de investigar as mesmas na alimentação humana. Utilizaram a técnica de

cromatografia líquida de alta eficiência com derivatização com ácido trifluoroacético e detector de fluorescência. Das 187 amostras analisadas, 26 (13,9%) apresentaram positividade para aflatoxinas, com média de 7,02 $\mu\text{g/kg}$, sendo que, em uma amostra, os níveis ficaram acima do recomendado pelo Mercosul (20 $\mu\text{g/kg}$).

Segundo GALVANO et al. (2005), entre os cereais, o milho é o mais freqüentemente contaminado por aflatoxinas, ao passo que o sorgo, arroz, cevada e trigo são menos susceptíveis.

O método de cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando colunas de imunoafinidade e derivatização com o reator pós-coluna KOBRACELL, apresentou algumas vantagens: alta reprodutibilidade, boa recuperação, dispensou o uso de reagentes agressivos ou instáveis como o ácido trifluoroacético ou iodo e rápida derivatização.

5 CONCLUSÕES

Os resultados médios de umidade relativa do ar e de umidade dos grãos obtidos ao longo dos meses dentro do armazém do Exército estiveram abaixo dos teores descritos em literatura como favoráveis ao desenvolvimento de aflatoxinas, o que demonstra que o controle desses fatores é um método efetivo para inibir o desenvolvimento de fungos toxigênicos.

A baixa incidência de aflatoxinas no total de amostras analisadas pode ser explicada pelos fatores acima, que impediram o desenvolvimento de fungos produtores de aflatoxinas, bem como, pelas características próprias da amostra.

O método de SOARES e RODRIGUES-AMAYA demonstrou ser de baixo custo, rápido e adequado para análise de rotina com número elevado de amostras. O extrato final obtido da limpeza da amostra foi límpido e claro, apresentando um resultado sem interferentes.

Os resultados obtidos para AFB₁ e AFB₂, por CLAE indicam a aplicabilidade do método para a determinação de baixos níveis de contaminação por Aflatoxinas em arroz.

Os limites encontrados de aflatoxinas B₁ por cromatografia líquida estiveram abaixo do limite previsto pela legislação brasileira, porém, como já foi citado anteriormente, não se tem conhecimento se estes valores representam ou não risco significativo para o desenvolvimento do câncer hepático.

Convém salientar, que estes resultados se referem a uma amostra regional, o Exército Brasileiro possui outros Batalhões e/ou Depósitos de Suprimentos em todas as regiões do Brasil onde se armazenam grandes quantidades de alimentos para consumo interno, em que, as condições climáticas, de transporte e armazenagem variam entre as diferentes regiões.

Por esta razão, o controle dos níveis de aflatoxinas nos alimentos em outras regiões do país, seria útil não só aos militares do Exército Brasileiro, como aos órgãos governamentais, fornecendo subsídios para ações de controle.

Apesar dos baixos níveis encontrados nesta pesquisa, a presença de micotoxinas em alimentos é um risco a saúde humana e animal, sendo necessárias medidas de controle em todos os níveis da cadeia alimentar, pelos riscos do efeito crônico da contaminação.

Baseados nesses dados, o estabelecimento de limites máximos de aflatoxinas em acordo com os níveis internacionais, seria um passo importante para o Brasil, no sentido de que, em um futuro próximo o país não sofra prejuízos comerciais por conta de barreiras sanitárias imposta pelos países importadores.

REFERÊNCIAS

- AMADO, M.A. **Aflatoxinas**: um problema mundial. Disponível em: http://ipv.pt/milenium/16_spec6.htm Acesso em: 11 mar 2003.
- ANDRADE, A.N. Micotoxinas: importância na alimentação. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 50, n.2, p.161- 163, 2004.
- AOAC. AOAC INTERNATIONAL. Natural Toxins. In: **Official Methods of Analysis**, Arlington, Virginia, AOAC (Chapter 49) 2000, p. 2-5.
- BEEBE, R. M. Reverse phase High Pressure Liquid Chromatographic Determination of Aflatoxin in foods. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, v.61, n.6, p.1347-1352, 1978.
- BAPTISTA, A. S. et al. Formas termolisada e viva de leveduras na redução de toxicidade causada por aflatoxinas. **Scientia agrícola**. v.59, n.2, p.257-260, abr./jun, 2002.
- BOEING, CR. **Micotoxinas**: causa de envenenamento alimentar. Disponível em: <<http://www.crq.org.br/solucao/numero18/noticia1.htm>> Acesso em: 28 jul 2003.
- BRASIL. Leis, decretos, etc. Portaria n. 183 do Ministério da agricultura e da reforma agrária. Art I Adotar regulamento técnico do MERCOSUL sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, amendoim e milho, aprovado pela resolução n. 56/94 do grupo Mercado comum do Sul de 01 de janeiro de 1995. **Diário Oficial da União**, Brasília, 25 mar de 1996
- BRASIL. Resolução n.34/76 da Comissão Nacional de Normas e padrões para alimentos.. Fixa padrões de tolerância para as aflatoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 19 jan.1977.Seção I, pt.I, p.710
- BRASIL. Resolução RDC nº 274 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o Regulamento Técnico Sobre Limites Máximos de Aflatoxinas Admissíveis no Leite, no Amendoim, no Milho. **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 de out. de 2002
- BRASIL. Resolução RE nº 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de jun. de 2003.
- CALDAS, E. D., SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista Saúde Pública**, v.36, n.3, p.319-323, jun, 2002.
- CARREIRO, G. Hepatite B e Hepatocarcinoma. **Revista Brasileira de Cancerologia**. Rio de Janeiro, v.50, n.2, p.166-169. 2004.

COELHO, R.L.M.; LEÃO, J.S.; SILVA, M.J.G.; GALDINO, M.L.; SOUZA, M.M.P. Ocorrência de aflatoxinas em amendoim, farinha de mandioca e arroz comercializados em Maceió-AL In: ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 12, 2001, Alagoas. **Anais ...** Maceió, 2001.

COMPANHIA DE ARMAZENS E SILOS DO ESTADO DE MINAS GERAIS. Disponível em: <http://www.casemg.com.br/serviços/armazem_conv.html> Acesso em 28 jun 2005.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P. S. Princípios básicos da cromatografia. In: **Introdução a métodos cromatográficos**. 6.ed. Campinas: Unicamp, 1995. p. 13-19.

CORRÊA, B. Fungos toxigênicos: panorama nacional. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICOTOXINAS E SIMPÓSIO DE ARMAZENAMENTO QUALITATIVAS DE GRÃOS DO MERCOSUL, 9., 1998, Florianópolis. **Atualidades em micotoxinas e armazenagem de grãos**. Florianópolis: Vildes M^o. Scussel, 2000. p.162-168.

COSTA, L.L. F; SCUSSEL, V.M. Toxigenic fungi in beans (*phaseolus vulgaris* L.) Classes black and color cultivated in the state of Santa Catarina, Brazil **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33 n.2 São Paulo, abr/jun. 2002.

COULOMBE, R.A. Aflatoxins. In: SHARMA, R.P. & SALUNKHE, D.K. **Mycotoxins and phytoalexins**. Boca Raton, CRC Press, 1991. p.103-43.

DIAZ, D.E., HAGLER, W.M., HOPKINS, B.A., WHITLOW, L. Aflatoxins binders I: in vitro binding assay for aflatoxin B1 by several potential sequestering agents. **Journal of Mycopathologia**. v.156: p.223-6, 2002.

DILKEN, M.; ARAÚJO D.D.F.; FICK,F; DILKEN P; MALLMAN A. Níveis de Aflatoxinas em arroz In: 1º CONGRESSO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE CASCAVEL E 1º SIMPÓSIO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS DO MERCOSUL, 2004, Cascavel-Paraná. **Anais** do 1º Congresso de Ciências Farmacêuticas de Cascavel e 1º Simpósio em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Mercosul. 2004, v., p. 93-94.

DIENER, U.H.; DAVIS, N.D. Aflatoxin production by isolates of aspergillus flavus. **Phytopathology**, v. 56, p.1390-1393, 1966

DOLL R, PETO R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. **Journal of the National Cancer Institute**. v.66, p.1191-308, 1981.

DUXBERY, D. Testing for mycotoxin control. **Food Technology**, Chicago, v. 58, n. 11, p. 78-80, 2004.

EUROPEAN COMMISSION, 1998. Commission Regulation (EC) n. 1525/98 of July 1998 (Amending Regulation (EC) n.194/97 of january 1997 setting maximum, levels

for certain contaminants in foodstuffs) **Official Journal of the European Communities**, L201, 17/07/1998 43-43.

EURACHEM GUIDES. **The fitness for purpose of analytical methods**. A laboratory guide to method validation and related topics. Teddington: LGC, 1998. p.15

FURLONG, E. B., SOARES, L. A. S., VIEIRA, A. P., DADALT, G. Aflatoxinas, ocratoxina a e zearelenona em alimentos da região sul do Rio Grande do Sul. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.58, n.2, p.105 –111. 1999.

FAO/WHO Expert Committee on Food Additives [JECFA]. **Safety evaluation of certain food additives and contaminants – Aflatoxins**. Geneva: World Health Organization; 1998.

Fonseca H. Sistema de amostragem para análise de aflatoxinas em grãos. **Revista de Microbiologia**. São Paulo, v. 21, n.2, p.66-70, 1991.

FONSECA, H. **Os fungos e a deterioração dos alimentos**: Boletim técnico n.4. Disponível em: <<http://www.micotoxinas.com.br/boletim4.htm>> Acesso em 28 jul 2003.

FONSECA, H. **Aflatoxina e outras micotoxinas**: aflatoxinas. Disponível em: <<http://www.micotoxinas.com.Br/legisla/html>> Acesso em 28 jul 2003.

FONSECA, H. **Micotoxinas** – Legislação. Disponível em: <http://www.micotoxinas.com.br>. Acesso em 03 nov 2004.

FREITAS, V.P.S.; BADOLATO, M.I.C. Incidência de aflatoxinas em paçocas e amendoim consumidas na cidade de Campinas, estado de São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 52, n. 1/2, p. 83-87, jan/jun 1992.

GALVANO, F. et al. Mycotoxins in the human food Chain. In :DIAZ, D.E. **The micotoxin blue book**. Nottingham: Nottingham University Press, 2005 p.187-223

GILL, J.L. Design and analysis of experiments in the animal and medical sciences. Ames: **The Iowa State University Press**, v.1, p.411, 1987.

GLORIA, E.M. et al. **Distribution of aflatoxin contamination in maize samples**. Campinas, v. 24, n.1, p.71-75. jan-mar. 2004.

GONCALVES, C S., PEREIRA, F, E. L. e GAYOTTO, L, C.C. Hepatocellular carcinoma in Brazil: report of a national survey (Florianópolis, SC, 1995). **Revista. Instituto de Medicina Tropical**. São Paulo, v.39, n.3. p.165-170, Maio/Jun, 1997.

HASS, Patrícia. **Exposição a AFB₁ e ocorrência de carcinoma hepatocelular nos estados de São Paulo e Santa Catarina**. Florianópolis, 2000. 113 f. Dissertação (mestrado) Universidade Federal de Santa Catarina.

HARRIS, C.C. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. **Cancer Research**, v.51, p. 5023-44, 1991.

HUSSEIN, S.H., BRASEL, J.M. **Toxicity, metabolism and impact of micotoxins on humans e animals Toxicology**, v. 167, n. 2, set, p 101-134, 2001.

IAL. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo: IAL 1985. 523p

INSTITUTO DE TECNOLOGIA DO PARANÁ. **Determinação de Aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ e ocratoxina A por cromatografia em camada delgada**. Instrução de ensaio. 2002

JAIMEZ, J.et al. Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 882, p.1-10, 2000.

KAIMOTO, A. M., FERREIRA, S.M.R. Perfil da qualidade do arroz parboilizado adquirido num sistema de alimentação coletiva. **Revista Higiene Alimentar**, v.15, n.89, p 79-89, out. 2001.

KLEIN, P.J.; BUCKNER,R.; KELLY,J.; COULOMBE JR., R.A. **Biochemical basis for the extreme sensitivity of turkeys to aflatoxin B₁**. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.165, n.1, p.45-52, 2000.

KREIF, W.METZGER. Determination of aflatoxins in medicinal herbs and plants extracts. **Journal of chromatography A**. v. 692, p.131-136, 1995.

KOCABAS, C.N. et al. The effects of Aflatoxin B1 on the development kwashiokor in mice. **Hum exp Toxicol**, p. 155-153, Mar., 2003.

LINO, C.M. **Research on medicinal plants. Contamination With Aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂**. Livro de atas do 1º Encontro Internacional de Plantas Aromáticas e Medicinais. **Ansião**, 1998, p. 112-117.

LIPIGORNGOSON, S; ALI, N.; YOSHIZAWA, T. Limited survey for aflatoxin contamination of rice imported into Japan. **Micotoxins**, v.53 n.2, p.95-101, 2003.

MALLMAN, C.A.; SANTÚRIO, J.M.; WENTZ, I. Aflatoxinas – aspectos clínicos e toxicológicos em suínos. **Ciência rural**. Santa Maria, v.24, n.3, p.635- 648, 1994.

MALLOZI, M.B.; CORRÊA, B. Fungos toxigênicos e micotoxinas. **Boletim técnico Instituto Biológico**., São Paulo, n.12, p.5-26, jul., 1998.

MELO, M.M., NASCIMENTO, E.F. e OLIVEIRA, N.J.F. Intoxicação de bovinos por aflatoxina B1 presente em polpa cítrica: relato de um surto. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia**, v.51, n.6, p.555-558, 1999.

MORAES, M.H. P; ABRANTES, S.M DOS SANTOS, R.P. Aflatoxinas em amendoim, ontem e hoje. **Revista Higiene Alimentar**, v.3, n.108, p 49-52, mai., 2003.

NUNES, I. L.; *et al.* Arroz comercializado na região sul do Brasil: aspectos micotoxicológicos e microscópicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 23, n.2, p.190-194.maio/ago, 2003.

OGIDO, Rony. **Efeitos da exposição prolongada de aflatoxina B1 e fumonisina B1 em codornas: avaliação de parâmetros de desempenho e qualidade dos ovos**. Pirassununga, 2003.109 f. Dissertação (mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo.

OLIVEIRA, C. A. F e GERMANO P. M. L. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. **Revista Saúde Pública**, v.31, n.4, p.417-424, ago., 1997.

OLIVEIRA, M. S.; PRADO, G.; JUNQUEIRA, R. G. Comparação das técnicas de cromatografia em camada delgada e Elisa na quantificação de aflatoxinas em amostras de milho. **Ciência Tecnologia de Alimentos**., v. 20, n.3, set/dez., 2000.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Micotoxinas**. Washington, 1983. (Critérios de salud ambiental, 11)

OSWEILER, G.D. Mycotoxins and livestock: what role do fungal toxins play in illness and production losses? **Vet. Med.**, v. 85, p. 89-94, 1990.

PÁDUA, I.P.M.; SILVEIRA, I. A; MARTINS, C.E.C.B. Aflatoxinas e risco de contaminação do leite humano. **Pró Homine**, Lavras, v.1, n.1, p.12-16, jul/dez., 2002.

PEREIRA, M.M.G.; CARVALHO, E. P.; PRADO, G.; crescimento e produção de aflatoxinas por *aspergillus flavus* e *aspergillus parasiticus* . **B. CEPPA**, Curitiba, v.20, n.1, p.141-156, jan/jun.2002.

PIEDEDE, F.S.; FONSECA, H.; GLÓRIA, E.M.; DOMINGUES, M.A.C.; PIEDEDE, S.M.S.; BARBIN, D. Distribution of aflatoxins in corn fraction visually segregated for defects. **Brazilian journal of microbiology**. n.33, p.250-254, 2002.

PITTET.A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds. an update review. **Rev. Méd. Vet** . Toulouse. v. 149, n.6, p 479-492, 1998.

PRADO, G; MATTOS, S.V.M.; PEREIRA, EC. Níveis de aflatoxinas em alguns alimentos consumidos em Belo Horizonte no período de 1983 a 1988. **Ciência Tecnologia de Alimentos**., v.9, n.2, p.138-147, jul/dez, 1989.

PRADO, G.; *et al.* Resistência de quatro genótipos de amendoim à produção de aflatoxina B1 após inoculação com *Aspergillus flavus* Link. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.19, n.1, p.84-87, Jan./Abr., 1999.

PRADO, G; MATTOS, S.V.M; PEREIRA, E.C. Níveis de aflatoxinas em alguns alimentos consumidos em Belo Horizonte no período de 1983 a 1988. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v 9, n.2, p 138-147, jul/dez., 1989.

PRADO, G; OLIVEIRA, M.S; CARVALHO, E.P; VELOSO,T; SOUSA, L..A.F.; CARDOSO, A.C.F. Aflatoxina M₁ em queijo prato e parmesão determinada por coluna de afinidade ecromatografia líquida. **Revista do instituto Adolfo Lutz**. v.60, n.2, p 147-151, 2001.

REIF, K.; METZGER, W. Determination of aflatoxins in medical herbs and plant extracts. **Journal of Chromatography A**, v. 692, p. 131-136, 1995.

RHÔNE DIAGNOSTICS TECNOLOGIES LTA. **Manual de instrução da coluna de imunoafinidade AFLACARD® para detecção aflatoxina B₁**. 2004.

ROSA, MFAP. **Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de aflatoxina B₁, aflatoxicol M₁ e aflatoxicol por Cromatografia por camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência em amostras de patê de fígado industrializado**. ITAGUAÍ, 1995. 60 f. Tese (Mestrado em Microbiologia Veterinária) - INSTITUTO DE VETERINÁRIA, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Técnicas analíticas para micotoxinas. In IV ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 4-8 outubro, 1988, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Analistas de Alimentos, 1989. p.239-244

SABINO, M; INOMATA, EI. ; LAMARDO, L.C.A. Variação dos níveis de aflatoxina B₁ em pasta de amendoim e paçoca consumidas no estado de São Paulo. **Revista de. Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v 42, n. ½, p. 39-44, jun/dez., 1982.

SABINO, M. Ocorrência e métodos analíticos para determinação de micotoxinas em grãos e rações. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE MICOTOXINAS E MICOTOXICOSES EM AVES, 1995, CURITIBA. **Características gerais das micotoxinas e micotoxicozes**. Campinas: FACTA, 1995. p. 35-37

SCUSSEL, V.M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998. 144 p.

SCUSSEL, V.M. **Estudo da incidência de aflatoxinas em amendoim (*Arachis hypogae* L.), milho (*zea mays* L.) e produtos derivados**. Campinas: UNICAMP, 1984. 138 p.

SIMIONATO, E. M. R. S.; ASTRAY, R. M.; SYLOS, C. M. de - Ocorrência de ocratoxina A e aflatoxinas em arroz. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v. 62, n.2: p.123 – 130, 2003.

SOARES, L.M.V., RODRIGUEZ- AMAYA, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-

layer chromatographic method. **Journal of Association of Official Analytical Chemists International**, v.72, n.1, p.22-26, 1989.

SILVA, L.C. **Fungos e micotoxinas em grãos armazenados**. Disponível em: < <http://www.Unioeste.br/agais/fungos.html> > Acesso em 29 ago 2003.

SKOOG, D. A.; HOLLER, J. F.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Bookman, 2002.

SMITH, JE; MOSS, MO. Mycotoxins: formation, analysis and significance. Chichester: **J. Wiley**, p.148, 1985.

STOLOFF, L Carcinogenicity of aflatoxins. **Science**; 1283-4, 1987.

TAVEIRA, J. A; MÍDIO, A. F. Aflatoxina M₁ – A micotoxina do leite. **Boi SBCTA**, v. 33, n.1, p.115-126, jan/jun., 1999.

TANAKA, Maria Aparecida de Souza, MAEDA, Jocely Andreuccetti e PLAZAS, Isabel Helena de Almeida Zeituni. Microflora fúngica de sementes de milho em ambientes de armazenamento. **Scientia Agrícola**, v.58, n.3, p.501-508, jul./set., 2001.

WHITAKER, T.B; SLATE, A.B; JOHANSON, A.S; Sampling feeds for mycotoxin analisis In :DIAZ, D.E. **The micotoxin blue book**, Nottingham: Nottingham University Press, 2005. p. 1-21.

WHO-IARC. **Monographs on the evolution of carcinogenic risks to humans**, 1993. v. 56, p. 245; 445.

ZOVICO, C. *et al.* Seleção eletrônica pela cor na descontaminação de amendoim contaminado com aflatoxinas. **Scientia agrícola**, v.56, n.2, p.371-376,1999.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - REGISTRO DE ENSAIOS/RESULTADOS DO LIAB - MICOTOXINAS POR CCD - QUANTIFICAÇÃO	66
APÊNDICE 2 - REGISTRO DE TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA DO AR / 5º BATALHÃO DE SUPRIMENTO	68
APÊNDICE 3 - REGISTRO DE TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA DO AR / CURITIBA Pr.....	72
APÊNDICE 4 - LAUDO DE INSPEÇÃO DE ALIMENTOS E BROMATOLOGIA DO 5º BATALHÃO DE SUPRIMENTO DO EXÉRCITO BRASILEIRO .	76
APÊNDICE 5 - GRÁFICOS DE CURVA DE CALIBRAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	78
APÊNDICE 6 - CROMATOGRAMA DE AMOSTRA CONTAMINADA ARTIFICIALMENTE	80
APÊNDICE 7 - CROMATOGRAMA DE CONTAMINAÇÃO NATURAL EM ARROZ POR AFLATOXINA B ₁	82

APÊNDICE 1 - REGISTRO DE ENSAIOS/RESULTADOS DO LIAB - MICOTOXINAS
POR CCD - QUANTIFICAÇÃO

LIAB	REGISTRO DE ENSAIOS/RESULTADOS
	MICOTOXINAS POR CCD - QUANTIFICAÇÃO

Análise: Especial Data: 18/10/2004

Material: arroz beneficiado polido peso inicial (g): 50g

Clarificante: Sulfato de Cobre 10% e celite

Reagentes utilizados : Solução padrão de Aflatoxina B1, B2, G1 e G2

Marca Sigma Aldrich

QUANTIFICAÇÃO :

Volume do extrato ressuspendido (μ l): 300 μ l

Conc. Padrões (μ g/ml): B1 1,45, B2 1,49, G1 1,54, G2 1,48,

Cromatografia: unidimensional X bidimensional

Cálculos :

$\mu\text{g/kg} = \frac{S \times Y \times V}{X \times W}$ S= μ l da sol. Padrão da toxina com intensidade de fluorescência igual
ao do X x W Y = concentração da solução padrão de toxina em $\mu\text{g/ml}$
V = volume de diluição de extrato final do material
X = μ l da solução do material com intensidade dme fluorescência igual
à do padrão
W = peso em gramas do material contido no extrato final

RESULTADOS

$\mu\text{g/Kg}$ B₁, Não detectada, B₂, Não detectada G₁ , Não detectada G₂ Não detectada

Técnicos : Cap Vet Jader, Cap Vet Patrícia, Ten Farm Flávia

APÊNDICE 2 - REGISTRO DE TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA DO AR / 5º
BATALHÃO DE SUPRIMENTO

REGISTRO DE TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA DO AR / 5º BATALHÃO
DE SUPRIMENTO
MÊS: DEZEMBRO 2003 - 5º BATALHÃO DE SUPRIMENTO

DIA	TEMP °C	UMIDADE RELATIVA DO AR %
01	17,6	66
02	25	79
03	28,2	60
04	23,1	71
05	26,2	80
06	25	76
07	21	-
08	21,6	88
09	22,9	77
10	22,3	67
11	27,7	81
12	22,8	66
13	22,1	75
14	25,4	-
15	29,1	85
16	23,4	89
17	17	90
18	18,7	88
19	19,3	65
20	22,3	80
21	20,9	-
22	27,1	71,9
23	19,8	68
24	19,8	73,9
25	19,7	68
26	20,3	67
27	21,6	-
28	26,4	-
29	25,9	75
30	25,4	76
31	20,6	75

MÊS: JANEIRO 2004 - 5º BATALHÃO DE SUPRIMENTO

DIA	TEMP °C	UMIDADE RELATIVA DO AR %
01	16,2	67
02	17,8	75
03	19,2	69
04	19,3	-
05	22,1	68
06	22,7	74
07	20,8	78
08	22,9	72
09	24,3	65
10	25,4	59
11	24,9	-
12	26,7	58
13	22,5	65
14	22,3	66
15	23,5	62
16	26,2	63
17	23,7	-
18	23,3	-
19	21,2	58
20	20,9	56
21	22,5	63
22	23	77
23	24	66
24	24,3	-
25	22,1	-
26	20,3	61
27	21,1	58
28	23,2	59
29	20,4	74
30	26,2	76
31	25,9	83

MÊS: FEVEREIRO 2004 - 5º BATALHÃO DE SUPRIMENTO

DIA	TEMP °C	UMIDADE RELATIVA DO AR %
01	27,5	70
02	27,4	65
03	27,1	63
04	26,6	60
05	28	63
06	29,2	68
07	28,2	73
08	17,9	69
09	20,7	65
10	20,9	62
11	20,3	55
12	21,4	67
13	23,4	68
14	24,2	67
15	23,2	68
16	22,2	74
17	26	70
18	27,8	78
19	26,4	70
20	20,4	70
21	23,6	62
22	19,8	55
23	20,8	60
24	22,1	77
25	20,9	80
26	24,8	77
27	25,6	75
28	23,1	80
29	24,6	88

APÊNDICE 3 - REGISTRO DE TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA DO AR /
CURITIBA PR

REGISTRO DE TEMPERATURA E UMIDADE RELATIVA DO AR / CURITIBA Pr
MÊS: DEZEMBRO 2003 - CURITIBA

DIA	TEMP °C	UMIDADE RELATIVA DO AR %
01	17,6	63,5
02	25	57,9
03	28,2	79,3
04	23,1	65,1
05	26,2	53,1
06	25	69,7
07	21	71,6
08	21,6	38,9
09	22,9	59,1
10	22,3	56,7
11	27,7	60,1
12	22,8	69
13	22,1	62,5
14	25,4	57,8
15	29,1	75,4
16	23,4	74
17	17	77
18	18,7	82
19	19,3	74,6
20	22,3	83,4
21	20,9	63,1
22	27,1	81,6
23	19,8	61,2
24	19,8	59,2
25	19,7	72,7
26	20,3	73,2
27	21,6	58,8
28	26,4	-
29	25,9	60,4
30	25,4	65,3
31	20,6	92,9

MÊS: JANEIRO 2004 - CURITIBA

DIA	TEMP °C	UMIDADE RELATIVA DO AR %
01	16,2	72,5
02	17,8	64,6
03	19,2	57,3
04	19,3	-
05	22,1	65,1
06	22,7	65,7
07	20,8	71
08	22,9	71,5
09	24,3	58,9
10	25,4	-
11	24,9	-
12	26,7	57,9
13	22,5	56,9
14	22,3	66,5
15	23,5	52,1
16	26,2	56,8
17	23,7	-
18	23,3	-
19	21,2	63,1
20	20,9	65,2
21	22,5	69,4
22	23	84
23	24	83,5
24	24,3	-
25	22,1	-
26	20,3	83,1
27	21,1	66,6
28	23,2	96,6
29	20,4	62,7
30	26,2	54,3
31	25,9	49,1

MÊS: FEVEREIRO 2004 - CURITIBA

DIA	TEMP °C	UMIDADE RELATIVA DO AR
01	27,4	-
02	27,1	51,3
03	26,6	57,1
04	28	61,2
05	29,2	51,6
06	28,2	56,7
07	17,9	-
08	20,7	-
09	20,9	88,5
10	20,3	60,3
11	21,4	60,6
12	23,4	64,8
13	24,2	61,2
14	23,2	-
15	22,2	-
16	26	67,8
17	27,8	56,4
18	26,4	60,6
19	20,4	78,7
20	23,6	69,6
21	19,8	-
22	20,8	-
23	22,1	-
24	20,9	-
25	24,8	
26	25,6	69,4
27	23,1	56,4
28	24,6	-
29	-	-

APÊNDICE 4 – LAUDO DE INSPEÇÃO DE ALIMENTOS E BROMATOLOGIA DO 5º
BATALHÃO DE SUPRIMENTO DO EXÉRCITO BRASILEIRO

1 MINISTÉRIO DA DEFESA EXÉRCITO BRASILEIRO CMS – 5ª RM/5ª DE 5º BATALHÃO DE SUPRIMENTO LABORATÓRIO DE INSPEÇÃO DE ALIMENTOS E BROMATOLOGIA (LIAB)	2 VISTO <hr/> JADER . DA SILVA – CAP Chefe do Laboratório																														
IDENTIFICAÇÃO DO LAUDO: a. LAUDO: FISCAL Nº: 010/04 b. ARTIGO: ARROZ BENEFICIADO E POLIDO TIPO I																															
IDENTIFICAÇÃO DO ARTIGO: a. Empenho nº: 018 de 03/11/03 b. Lote: 27.000 Kg c. Nota Fiscal nº: 14399 de 26/11/03 d. Firma: Alimentícios Santa Cruz Ltda – Itaporã-MS. e. Laudo requisitado pelo (a): Gestor do AV/CF f. Amostra colhida pelo (a): Cap Jader Quantidade: 5,0 Kg Utilizada: 3,0 Kg g. Características do artigo: Arroz Guacira - Alimentícios Santa Cruz Ltda – Itaporã-MS – fab: 21/09/05 val: 21/09/05 – Lote 1102.																															
RESULTADO DA ANÁLISE: a. Exame do recipiente: EM BOM ESTADO b. Exame do conteúdo (peso/volume): Bruto: 50,1 Kg Líquido: 50,0 Kg c. Caracteres organolépticos: Normais e próprios do produto. d. Outras determinações: <table border="1" data-bbox="280 1056 1333 1402"> <thead> <tr> <th></th> <th>RESULTADO</th> <th>TOLERÂNCIA</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Umidade</td> <td>12,25 %</td> <td>14,0 % Máx.</td> </tr> <tr> <td>Matérias estranhas e impurezas</td> <td>0,00 %</td> <td>0,50 % Máx.</td> </tr> <tr> <td>Mofados e ardidos</td> <td>0,25 %</td> <td>0,25 % Máx.</td> </tr> <tr> <td>Manchados e/ou picados</td> <td>0,25%</td> <td>12,00 % Máx.</td> </tr> <tr> <td>Amarelos</td> <td>0,23%</td> <td>12,00 % Máx.</td> </tr> <tr> <td>Gessados</td> <td>1,47 %</td> <td>15,00 % Máx.</td> </tr> <tr> <td>Rajados</td> <td>1,47 %</td> <td>10,00 % Máx.</td> </tr> <tr> <td>Gerais Agregados</td> <td>1,75 %</td> <td>4,00 % Máx.</td> </tr> <tr> <td>Quebrados</td> <td>7,84%</td> <td>10,00 % Máx.</td> </tr> </tbody> </table> Análise microscópica: Ausência de larvas, parasitos vivos, mofo e fermentações Teste de cocção: normal			RESULTADO	TOLERÂNCIA	Umidade	12,25 %	14,0 % Máx.	Matérias estranhas e impurezas	0,00 %	0,50 % Máx.	Mofados e ardidos	0,25 %	0,25 % Máx.	Manchados e/ou picados	0,25%	12,00 % Máx.	Amarelos	0,23%	12,00 % Máx.	Gessados	1,47 %	15,00 % Máx.	Rajados	1,47 %	10,00 % Máx.	Gerais Agregados	1,75 %	4,00 % Máx.	Quebrados	7,84%	10,00 % Máx.
	RESULTADO	TOLERÂNCIA																													
Umidade	12,25 %	14,0 % Máx.																													
Matérias estranhas e impurezas	0,00 %	0,50 % Máx.																													
Mofados e ardidos	0,25 %	0,25 % Máx.																													
Manchados e/ou picados	0,25%	12,00 % Máx.																													
Amarelos	0,23%	12,00 % Máx.																													
Gessados	1,47 %	15,00 % Máx.																													
Rajados	1,47 %	10,00 % Máx.																													
Gerais Agregados	1,75 %	4,00 % Máx.																													
Quebrados	7,84%	10,00 % Máx.																													
PARECER: (da amostra analisada) O produto examinado é ARROZ BENEFICIADO E POLIDO TIPO I ; é a amostra representativa da partida analisada , própria para o consumo e atende as exigências contidas no CEAS																															
Os dados transcritos neste laudo conferem com as análises realizadas, pelo que emito o parecer acima. <div style="text-align: right;"> Quartel em Curitiba - PR, 11 de março de 2004. </div> <div style="text-align: right; margin-top: 20px;"> <hr/> JADER OLIVEIRA DA SILVA – CAP Inspetor </div>																															

APÊNDICE 5 - GRÁFICOS DE CURVA DE CALIBRAÇÃO POR CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

APÊNDICE 6 - CROMATOGRAMA DE AMOSTRA CONTAMINADA
ARTIFICIALMENTE

APÊNDICE 7 - CROMATOGRAMA DE CONTAMINAÇÃO NATURAL EM ARROZ
POR AFLATOXINA B₁

ANEXOS

REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA CROMATOGRAFIA EM CAMADA
DELGADA UNIDIMENSIONAL, EM PLACA 20X20 cm, PARA AFLATOXINAS

